

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Syame KHATER

soutenue le : **21 novembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Rationalisation des procédures de séparation
des composés chiraux à visée
pharmaceutique et cosmétique**

THÈSE dirigée par :
Caroline WEST

Maitre de conférences, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Alain BERTHOD

Directeur de recherche, CNRS UMR 5280 Lyon

Pascal CARDINAEL

Professeur, Université de Rouen, EA 3233

JURY :

Pr. Pascal BONNET

Président du jury, Université d'Orléans

Dr. Alain BERTHOD

Université de Lyon

Pr. Pascal CARDINAEL

Université de Rouen

Dr. Pilar FRANCO

Chiral Technologies

Dr. Caroline West

Université d'Orléans

Ce projet de recherche a été réalisé à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (Université d'Orléans), dans le cadre d'une bourse ministérielle, et s'intitule « rationalisation des procédures de séparation des composés chiraux à visée pharmaceutique et cosmétique ». Ce travail a été supervisé par le Dr. Caroline West.

Publications dans des revues à comité de lecture

(1) Khater, S., West, C.

Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with polysaccharide stationary phases

Journal of Chromatography A, 2014, 1373, 197-210

(2) Khater, S., West, C.

Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for the direct determination of enantiomeric purity of provitamin B5 in cosmetic formulations with mass spectrometric detection

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 102, 321-325

(3) Khater, S., Zhang, Y., West, C.

Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography III. Non-halogenated polysaccharide stationary phases

Journal of Chromatography A, 2014, 1363, 278-293

(4) Khater, S., Zhang, Y., West, C.

Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography IV. Chlorinated polysaccharide stationary phases

Journal of Chromatography A, 2014, 1363, 294-310

(5) Khater, S., Zhang, Y., West, C.

In-depth characterization of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography.

Journal of Chromatography A, 2013, 1303, 83-93.

(6) Khater S., West C.; Lesellier E

Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography

Journal of Chromatography A, 2013, 1319, 148-159.

(7) West C.; **Khater S.**; Lesellier E.

Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography.

Journal of Chromatography A, 2012, 1250, 182-195.

Publications dans des revues sans comité de lecture

(8) West C.; **Khater S.**; Khalikova M.; Lesellier E.

Classification of Columns for SFC Use

The Column, 2014, 10, 2-8

(9) Khater, S., West, C.

Evaluation of the Complementarity of Three RegisChiral Stationary Phases in Supercritical Fluid Chromatography

LC-GC, The application notebook, 2012, p.70

Chapitre d'ouvrage

(10) West, C., **Khater, S.**, Lesellier, E.

Packed-column Sub- and Supercritical Fluid Chromatography

“Analytical Separation Sciences, 6 volumes”, Anderson, Berthod, Stalcup, Pino Eds. vol. 3, chapter 4, Wiley-VCH.

Accepté à publication, septembre 2014.

Communications orales

(1) Khater, S., West, C.;

A rational view of enantioseparation in supercritical fluid chromatography

ISC 2014 (Septembre) – Salzburg (Autriche)

(2) West, C.; Khater, S.

Towards a better understanding of enantioselective SFC

HPLC 2013 - Amsterdam (Pays-Bas).

(3) Khater, S.; Lesellier, E.; West, C.

Characterization of five complementary achiral stationary phases and their application in Ultrapformance convergence chromatography (UPC²).

Waters worldwide User Meeting 2012 - Bruxelles (Belgique).

(4) Khater, S., West, C.;

Comprendre le mécanisme de reconnaissance chirale en SFC: plus qu'une lubie, un véritable challenge.

Journées du Club jeunes Ile de France de l'AfSep 2014 – Paris (France).

(5) Khater, S. ; West, C.

Analyse chirale en chromatographie en phase supercritique : méthode et applications

Journées de la section régionale de la Société Chimique de France 2012 – Poitiers (France)

(6) Khater, S. ; West, C.

Caractérisation de phases stationnaires chirales tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) de cellulose en SFC.

Journées du Club jeunes Ile de France de l'AfSep 2012 - Paris (France)

Communications par affiche

(1) Khater, S. ; Canault, B.; Azzimani, T.; West, C.

Is the enantioseparation factor a constant on a chiral separation system?

ISC 2014 – Salzburg (Autriche)

(2) Khater, S.; Golib F.; Bonnet P.; West, C.

Chemoinformatics strategies to probe chiral chromatography

Chirality 2014 – Prague (République Tchèque)

(3) Khater, S. ; West, C.

Evaluation of macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography

Chirality 2014 – Prague (République Tchèque)

(4) Khater, S.; Lozac'h, M.-A. ; Adam, I.; Francotte, E.; West, C.

Chiral HPLC to chiral SFC: an easy transfer?

HPLC 2013 - Amsterdam (Pays-Bas).

(5) West, C.; **Khater, S. ;** Lesellier, E.

Comparison of pentafluorophenyl phases in supercritical fluid chromatography

HPLC2013 - Amsterdam (Pays-Bas).

(6) Khater, S.; West, C.

Comparison of chlorinated polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography

HPLC2013 - Amsterdam (Pays-Bas).

(7) Khater, S. ; West, C.

Analyse chirale en chromatographie en phase supercritique : une méthode performante pour comprendre un mécanisme obscur

SEP 2013 – Paris (France)

(8) Khater, S. ; West, C.

De l'HPLC vers la SFC chirale : le transfert de méthode : un travail sans peine ?

SEP 2013 – Paris (France)

(9) West C.; **Khater S.;** Lesellier E.

Use of HILIC-type stationary phase in SFC.

HPLC 2012- Anaheim (USA).

(10) Khater, S.; West, C.

Chemometric methods to improve understanding of chiral separations

CAC 2012 - Budapest (Hongrie).

(11) Khater, S.; West, C.

Influence of alcohol mobile-phase modifier on the retention and selectivity of polysaccharide chiral stationary phases in SFC

SFC 2012 - Bruxelles (Belgique).

(12) Khater, S. ; Lesellier, E. ; West, C.

Characterisation of five complementary achiral stationary phases and their application in Ultra-Performance Convergence Chromatography (UPC²)

SFC 2012 - Bruxelles (Belgique).

(13) Khater, S.; West, C.

In-depth characterisation of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) in SFC

SFC 2012 - Bruxelles (Belgique).

Remerciements

Merci, thank you, danke, grazie, obrigado, takk, köszönöm, mulțumesc, choukrane, Dziękuję

C'est avec un petit pincement au cœur que je commence à rédiger mes remerciements. C'est une aventure que je n'ai pas menée seule et j'espère n'oublier personne.

Je remercie tout d'abord Alain Berthod (Université de Lyon 1) et Pascal Cardinael, (Université de Rouen) d'avoir accepté d'être les rapporteurs scientifiques de ma thèse, ainsi que Pascal Bonnet et Pilar Franco d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Ce projet a été réalisé à l'Institut de Chimie Organique et Analytique dans le service Sciences Analytique du professeur Claire Elfakir. Mes remerciements les plus sincères vont à ma directrice de thèse, Caroline West, pour sa gentillesse, sa patience, sa confiance et son amitié, ses encouragements et son regard critique ☺. Un grand MERCI pour cette aventure et les opportunités incroyables ! J'adresse également mes remerciements à Eric Lesellier pour ses précieux conseils et son soutien amical pendant ces 3 années.

Je suis très redevable envers Eric Brohan, Eric Francotte, Pilar Franco et Yingru Zhang et Christina Kraml de m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et partagé des discussions très enrichissantes. J'adresse également mes remerciements à Olle Gyllenhaal, Hélène Boiteux, Mireille Schaeffer, Tivadar Farkas, Jelena Kocergin, Albin Maisch, Dave Bale, Bernt Larsson, Margaretha Svensson et Remy Joseph pour les moyens mis en œuvre et leur grande confiance.

Je remercie tous mes collègues qui ont contribué à créer une ambiance de travail agréable : mes vieux acolytes Hala, Aleksander et Aleksandra ; ma grande sœur Laetitia ; Mon « bureau du nord » Mymy la chipie, David la pie bavarde et Florian le gentil ; La « team supercritique » avec mes SUPER grandes amies Carla, Anita, Maria et Elise ; la pétillante Nathalie Percina ; les collègues du « café de 8h00 » Reine, Bérengère et Agnès. Merci à Laodges et Alain-Michel qui ont changé mes bouteilles de CO₂, jour et nuit, qu'il pleuve, qu'il vente ou qu'il neige, avec le sourire ; merci à Emilie pour ta gentillesse et ton aide tout au long de mon cursus ; la maman des thésards Sandrine et n'oublie pas « Qui aime bien, châtie bien » ; Une pensée à choucha, zazu et lili rose avec qui j'ai partagé les rires et les doutes de cette dernière année. Merci les filles d'avoir supporté mes humeurs, mes coups de gueule et mes doutes. Merci à la fraîcheur de tous les petits stagiaires que j'ai embêté Dany,

Remerciements

Merci, thank you, danke, grazie, obrigado, takk, köszönöm, mulțumesc, choukrane, Dziękuję

Mathieu, Baptiste, Taoufik, Alain, Jieye, Anna. Je tiens à saluer également Yann et Marie-Madelaine pour m'avoir aidé lors de tâches administratives. Je n'oublie pas les collègues du premier étage !

J'aurais eu du mal à réaliser ce travail sans le soutien et les encouragements de ma famille et mes amis pendant 3 ans. Enfin, il m'est impossible de ne pas remercier David pour sa patience, son soutien moral et sa philosophie de vie que j'aime tant. Il a su me mettre dans les meilleures conditions pour réussir. Ce travail, je te le dédie.

Sommaire

Liste des abréviations	14
------------------------------	----

Liste des figures.....	15
------------------------	----

Liste des tableaux.....	20
-------------------------	----

Introduction générale... ..	23
-----------------------------	----

Synthèse bibliographique

I. LES FLUIDES SUPERCRITIQUES ET LEUR EMPLOI EN CHROMATOGRAPHIE ... 27

1. HISTORIQUE	27
2. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE DE NOS JOURS	28
2.1. Définitions	28
2.2. Les fluides supercritiques – Le dioxyde de carbone.....	29
2.2.1. Caractéristiques générales	29
2.2.2. Polarité du CO ₂	30
2.3. Des propriétés particulières	31
2.3.1. Viscosité.....	31
2.3.2. Pouvoir solvant	33
3. APPLICATIONS.....	35
3.1. Applications industrielles du CO₂ supercritique	35
3.2. Approches chromatographiques.....	36
3.3. La SFC préparative.....	38
4. CONCLUSION	41

II. LA CHIRALITE 43

1. HISTORIQUE	43
2. LA STEREOCHIMIE	43
2.1. Définition.....	43
2.2. Propriétés.....	45
2.3. Nomenclature.....	47
2.3.1. Configuration absolue	47
2.3.2. Cas particulier des glucides et des acides aminés.....	47
3. CHIRALITE ET CHIMIE DU VIVANT	48
4. CHIRALITE ET DOMAINE PHARMACEUTIQUE.....	49

Sommaire

III. LES SEPARATIONS ENANTIOSELECTIVES.....	53
1. AVANT-PROPOS.....	53
2. LES PHASES STATIONNAIRES CHIRALES	55
2.1. Généralités.....	55
2.2. Les phases stationnaires chirales de type Pirkle.....	58
2.3. Les phases stationnaires chirales de type polysaccharide.....	59
2.3.1. Contexte	59
2.3.2. Cellulose triacétate	60
2.3.3. Optimisation des polysaccharides : nature et morphologie du support.....	61
2.3.4. Optimisation des polysaccharides : procédé du dépôt.....	62
2.3.5. Optimisation des polysaccharides : nature du ligand.....	62
2.3.6. Optimisation des polysaccharides : technique d'immobilisation.....	65
2.4. Les phases macrocycliques	69
2.4.1. Les cyclodextrines.....	69
2.4.2. Les cyclofructanes.....	71
2.4.3. Les Glycopeptidiques Macrocycliques.....	71
IV. CONCLUSION ET INTRODUCTION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	74
REFERENCES DU CHAPITRE I.....	76

Chapitre II

I. UNE STRATEGIE CHEMOINFORMATIQUE.....	86
1. LES RELATIONS QUANTITATIVES STRUCTURE-RETENTION.....	86
2. APPLICATION AUX SEPARATIONS CHIRALES	89
3. ANALYSE FACTORIELLE DISCRIMINANTE	90
II. APPLICATION DE LA STRATEGIE CHEMOINFORMATIQUE A LA CARACTERISATION DE PHASES STATIONNAIRES DE TYPE POLYSACCHARIDE	93
ARTICLE N°1: IN-DEPTH CHARACTERIZATION OF SIX CELLULOSE TRIS-(3,5- DIMETHYLPHENYL CARBAMATE) CHIRAL STATIONARY PHASES IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY	93
ARTICLE N°2: INSIGHTS INTO CHIRAL RECOGNITION MECHANISM IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY III. NON-HALOGENATED POLYSACCHARIDE STATIONARY PHASES	105
ARTICLE N°3: INSIGHTS INTO CHIRAL RECOGNITION MECHANISM IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY IV. CHLORINATED POLYSACCHARIDE STATIONARY PHASES	105

Sommaire

III. APPLICATION DE LA STRATEGIE CHEMOINFORMATIQUE A LA CARACTERISATION D'AUTRES CHIMIES DE PSC	139
--	-----

REFERENCES DU CHAPITRE II	147
---------------------------------	-----

Chapitre III

I. PREAMBULE	151
--------------------	-----

II. INFLUENCE DU MODIFICATEUR EN SFC CHIRALE.....	152
---	-----

<i>ARTICLE N°4: INSIGHTS INTO CHIRAL RECOGNITION MECHANISM IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY V. EFFECT OF THE NATURE AND PROPORTION OF ALCOHOL MOBILE PHASE MODIFIER WITH POLYSACCHARIDE STATIONARY PHASES</i>	
	153

III. COMPARAISON DES PHASES MOBILES LIQUIDES ET SUPERCRITIQUES.....	167
---	-----

1. INTRODUCTION.....	167
2. RESULTATS	169
2.1. <i>Propriétés de rétention</i>	169
2.1.1. Résultats préliminaires	169
2.1.2. Etudes détaillées des propriétés de rétention	170
2.1.3. Force éluante.....	174
2.2. <i>Propriétés de séparation</i>	176
3. CONCLUSION	180

IV. INFLUENCE DES ADDITIFS SUR LES SEPARATIONS CHIRALES EN SFC	181
--	-----

1. INTRODUCTION.....	181
2. RESULTATS	182
3. CONCLUSION	187

RÉFÉRENCES DU CHAPITRE III	189
----------------------------------	-----

Sommaire

Chapitre IV

I. PREAMBULE	194
II. CARTOGRAPHIE RETENTIVE	196
III. CARTOGRAPHIE SEPARATIVE	204
IV. CONCLUSIONS.....	208
REFERENCES DU CHAPITRE IV.....	209

Chapitre V

I. PREDICTION DE LA RETENTION D'APRES L'APPROCHE LSER.....	212
II. PREDICTION DE LA SEPARATION	216

Conclusion générale	224
----------------------------------	------------

Annexes

A. DESCRIPTEURS MOLECULAIRES	226
B. METHODES D'ANALYSES DE DONNEES	227
C. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DIRECT DETERMINATION OF ENANTIOMERIC PURITY OF PROVITAMIN B5 IN COSMETIC FORMULATIONS WITH MASS SPECTROMETRIC DETECTION.....	230
D. CONDITIONS OPERATOIRES DU CHAPITRE III.....	236

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composante principale
AFD	Analyse factorielle discriminante
AMM	Autorisation de mise sur le marché
CD	cyclodextrine
CIP	Cahn, Ingold et Prelog
EC	Electrophorèse capillaire
ECD	Dichroïsme circulaire électronique
e.e	Excès énantiomérique
FS	Fluide supercritique
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquid haute performance)
HTLC	High Temperature Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute température)
LLE	Extraction liquide-liquide
LSER	Linear Solvation Energy Relationship
SFC	Supercritical Fluid Chromatography (Chromatographie en phase supercritique)
P_C	Pression critique
PM / PSC	Phase mobile et phase stationnaire chirale
pSFC	Packed column SFC (SFC sur colonne remplie)
QSRRs	Quantitative Structure-Retention relationships
RESS	Rapid Expansion of supercritical solutions (détente rapide d'une solution supercritique)
SMB	Simulated moving bed
SMC	Steady moving column
SRR	Steady-state Recycling
T_C	Température critique
P_C	Pression critique
UHPLC,	Chromatographie liquid à ultra haute pression
RESS	Rapid Expansion of Supercritical Solutions
NPLC	Normal Phase Liquid Chromatography
TG	Triglycérides

Liste des figures

Synthèse bibliographique :

Figure 1.1	Diagramme de phase d'un corps pur.....	28
Figure 1.2	Evolution de l'interface biphasique liquide/vapeur due à une augmentation des paramètres thermodynamiques (P, T) jusqu'au point critique.....	29
Figure 1.3	A gauche couplage Chiralpak ID- Synergi Polar RP. A droite, couplage Synergi Polar RP- Chiralpak ID. Analyse de 4 pesticides sur le système Acquity UPC ² : MeOH/EtOH (50 :50) dans CO ₂ , gradient 2% à 10% en co-solvants, débit : 3 ml/min, température : 55°C, pression de sortie : 105 bars, λ : 244 nm (résultats non publiés).....	33
Figure 1.4	Les différentes phases des essais cliniques.....	38
Figure 1.5	Principe de la chromatographie à lit mobile simulé.....	40
Figure 1.6	Entité moléculaire chirale, non superposable à son image spéculaire.....	44
Figure 1.7	Stéréoisomères du 2,3,4-trihydroxy-butanol.....	44
Figure 1.8	Exemples de molécules chirales liées à la présence d'un centre stéréogène. (a) flurbiprofen, (b) isocarbophos, (c) base de Tröger, (d) oméprazole.....	45
Figure 1.9	Exemples de molécules chirales liées à la présence d'un axe de symétrie (a) Phéromone de la bruche du haricot chirale, (b) Le Gossypol.....	45
Figure 1.10	Projection de Fischer du glycéraldéhyde.....	47
Figure 1.11	Configuration L des acides aminés de gauche à droite : L-alanine, L-sérine, L-leucine...	48
Figure 1.12	Structure du L-Aspartyl-L-phénylalanate de méthyle.....	48
Figure 1.13	R) - (+) – Thalidomide.....	50
Figure 1.14	L'intermédiaire de synthèse d'un principe actif chiral et son agent de dédoublement (2S)-N-acetyl-leucine.....	53
Figure 1.15	Structure du sélecteur O-9-tert-butylcarbamate de quinine et quinidine Chiralpak QN-AX (8S, 9R) et Chiralpak QD-AX (8R, 9S), commercialisés par Daicel.....	55
Figure 1.16	Structure de la PSC (S,S)-Whelk-O1.....	59
Figure 1.17	Structure de (a) la cellulose native, de (b) l'amylose native et de (c) la chitosane native .	60
Figure 1.18	Structure de la cellulose triacétate.....	61
Figure 1.19	Structure des dérivés cellulose tribenzoates.....	63
Figure 1.20	Structure des dérivés cellulose trisphénylcarbamate.....	64
Figure 1.21	Procédé d'immobilisation de la cellulose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) développé par Okamoto en 1987.....	66
Figure 1.22	Procédé de fixation par réaction du polysaccharide « mixte » avec un gel de silice allyle	67
Figure 1.23	immobilisation par copolymérisation radicalaire.....	68

Liste des figures

Figure 1.24	Structure de α -CD, β -CD et γ -CD.....	70
Figure 1.25	mécanisme (a) d'inclusion et (b) interactions de surfaces	70
Figure 1.26	Structure des cyclofructanes n=1, CF6 ; n=2 CF7 ; n=3, CF8.....	71
Figure 1.27	Structures de macrocycles glycopeptides (a) Teicoplanin, (b) Vancomycin et (c) Ristocetin.....	72

Chapitre II :

Figure 2.1	Aborder le mécanisme de reconnaissance chirale sous deux aspects.....	85
Figure 2.2	Méthodologie des QSRR, d'après la Ref [3].....	86
Figure 2.3	Description des propriétés structurales et des interactions relatives au modèle LSER.....	87
Figure 2.4	Classification de phases stationnaires achirales en SFC. Conditions: CO ₂ – méthanol 90:10 (v/v), 25°C, 150 bar, 3 ml/min.....	88
Figure 2.5	Structure des supports à base de cellulose (Chiralcel OD) et d'amylose (Chiralpak AD).....	90
Figure 2.6	Stratégie de l'AFD 2 classes.....	91
Figure 2.7	Stratégie de l'AFD 3 classes.....	91
Figure 2.8	Structure de la PSC (S,S)-Whelk-O1.....	139
Figure 2.9	Agglomération des PSC selon (a) leur rétention et (b) leurs capacités énantiosélectives.....	140
Figure 2.10	Constantes Béta du modèle de Whelk-O1	141
Figure 2.11	Caractérisation rétentive des PSC Chiralpak AD, Chiralcel OD et Lux Cellulose-2 à l'aide du modèle modifié des paramètres de solvation (Eq. 3).....	142
Figure 2.12	Modèles discriminant les racémiques « élués avant » et « après » la prédiction de rétention sur Whelk-O1. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques élués avant la prédiction de rétention (classe 1 et classe 3). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques élués après la prédiction de rétention (classe 2 et classe 4).....	143
Figure 2.13	Modèles discriminant les racémiques séparés et co-élués sur Whelk-O1. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques co-élués (classe 3 et classe 4). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques séparés (classe	144

Liste des figures

	1 et classe 2).....	
Figure 2.14	Analyse du (a) 1-phenyl-2-propyn-1-ol, (b) phenylvinylcarbinol et (c) 1-phenyl-1-propanol sur Whelk-O1.....	145
Figure 2.15	Analyse du (a) 6- methoxyflavanone et (b) 4,5,7-trihydroxyflavanone sur Whelk-O1.....	145

Chapitre III :

Figure 3.1	Séparation du Nutlin-3 sur Chiralcel OD-H en (a) RPLC (acétonitrile : eau (40 :60)), (b) PO (Methanol), (c) NPLC (hexane-Ethanol (70:30)) et (d) SFC (CO ₂ -MeOH (65 :35))	168
Figure 3.2	Agglomération des systèmes chromatographiques selon leurs capacités rétentes (distance Euclidienne, agglomération selon la méthode de Ward).....	171
Figure 3.3	Modèles LSER (coefficients normalisés) des systèmes chromatographiques obtenus sur Lux Cellulose-1 avec l'éthanol en chromatographie en phase supercritique (SFC) et à polarité en phase normale (NPLC).....	171
Figure 3.4	Variation de la rétention (log k) pour une série d'alkylbenzènes homologues en fonction du nombre de carbones dans la chaîne alkyle, en SFC (●) et en NPLC (●) avec l'éthanol comme co-solvant.....	173
Figure 3.5	Evaluation de la force éluante entre le mode SFC et NPLC.....	174
Figure 3.6	Rétention des énantiomères 1 et 2 de 6 formes racémiques sur Chiralpak AD en SFC et en NPLC. *Collaboration avec Novartis Institutes for BioMedical Research (Eric Francotte)	175
Figure 3.7	Rétention des énantiomères 1 et 2 de 6 formes racémiques sur Chiralpak IC en SFC et en NPLC. *Collaboration avec Novartis Institutes for BioMedical Research (Eric Francotte)	175
Figure 3.8	Analyse du binaphthol en NPLC (heptane-2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min, 25°C), en SFC (CO ₂ -2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min et 4 ml/min, 40°C). *Collaboration avec Novartis Institutes for BioMedical Research (Eric Francotte).....	176
Figure 3.9	Comparaison des facteurs de séparation (log α) en SFC et en NPLC, en utilisant l'éthanol (EtOH) ou l'isopropanol (2PrOH) comme modificateur.....	177
Figure 3.10	Modèles discriminant les racémiques « élués avant » et « après » la prédiction de rétention sur Lux Cellulose-1 dans les deux modes chromatographiques. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques élués avant la prédiction de rétention (classe 1 et classe 3). Les caractéristiques positives sont communes aux	178

Liste des figures

	racémiques élués après la prédiction de rétention (classe 2 et classe 4).....	
Figure 3.11	Modèles discriminant les racémiques séparés et co-élus sur Lux Cellulose-1 dans les deux modes chromatographiques. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques co-élus (classe 3 et classe 4). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques séparés (classe 1 et classe 2).....	179
Figure 3.12	Comparaison de la rétention des composés achiraux sur Chiralpak IB en présence ou non d'additifs.....	183
Figure 3.13	Les coefficients béta (e, s, a, b, v, f et g) issus d'une régression linéaire multiple sur Chiralpak IB (a) sans et (b) en présence de l'isopropylamine et l'acide trifluoroacétique. Chaque bar représente la contribution d'une interaction à la rétention.....	183
Figure 3.14	Comparaison des facteurs de séparation des racémiques obtenus dans des conditions avec et sans additifs sur Chiralpak IB.....	184
Figure 3.15	Zoom de la Fig. 3.24 afin de mettre en évidence les plus faibles valeurs des facteurs de séparation.....	184
Figure 3.16	Diagrammes de Venn représentant les performances globales de Chiralpak IB en présence (simultanée d'isopropylamine et d'acide trifluoroacétique) ou non d'additifs.....	185
Figure 3.17	Les coefficients béta obtenus par régression linéaire multiple sur Chirobiotic T (a) sans, (b) en présence d'acide formique et (c) en présence de diéthylamine.....	186
Figure 3.18	Diagrammes de Venn représentant les performances globales de Chirobiotic T en présence ou non d'additifs (acide formique ou diéthylamine).....	187

Chapitre IV :

Figure 4.1	Le score plot représente la projection des PSC en fonction des constantes du système.....	197
Figure 4.2	Zoom sur la zone des phases halogénées et projection des PSC dans un espace à trois dimensions par MultiDimensional Scaling.....	198
Figure 4.3	Cartographie rétentive des phases stationnaires chirales en SFC.....	200
Figure 4.4	Agglomération des PSC selon leur rétention en SFC.....	202
Figure 4.5	Agglomération des PSC selon leurs capacités énantiosélective en SFC.....	205

Liste des figures

Figure 4.6	Cartographie énantiosélective des phases stationnaires chirales en SFC.....	206
-------------------	---	-----

Chapitre V :

Figure 5.1	Approche LSER appliquée dans un but prédictif.....	212
Figure 5.2	Structure du métalaxyl	213
Figure 5.3	Prédiction de la rétention sur les systèmes Lux Cellulose-1/modificateur du métalaxyl....	214
Figure 5.4	Structure du Glutethimide.....	214
Figure 5.5	Prédiction de la rétention sur les phases Glycopeptides Macrocycliques du Glutethimide.....	215
Figure 5.6	Set de composés chiraux utilisés pour prédire la séparation à l'aide des AFD 2 classes.....	216

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Paramètres thermodynamiques de certains fluides supercritiques.....	29
Tableau 1.2	Propriétés physiques des gaz, liquide et fluide supercritique.....	31
Tableau 2.1	Constantes du système obtenues par analyse LSER	142
Tableau 4.1	Classification de phases stationnaires chirales proposée par Wainer.....	194
Tableau 4.2	Coefficients, obtenus par régression linéaire multiple, caractérisant les interactions contribuant à la rétention sur chacune des PSC étudiées.....	196
Tableau 4.3	Variabilité expliquée par les composantes principales.....	197
Tableau 5.1	Equations LSER sur les systèmes Lux Cellulose-1/modificateur.....	213
Tableau 5.2	Equations LSER sur les systèmes glycopeptides macrocycliques employant comme phase mobile un mélange CO ₂ /MeOH	214
Tableau 5.3	Descripteurs moléculaires des racémiques du jeu de validation.....	217
Tableau 5.4	Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction « racémiques séparés - vrai positif » et « racémiques co-élus – vrai négatif ».....	218
Tableau 5.5	Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction « racémiques élus avant la prédiction - vrai positif » et « racémiques élus après la prédiction – vrai négatif ».....	220
Tableau 5.6	Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction pour les racémiques élus avant la prédiction « séparés - vrai positif » et « co-élus – vrai négatif ».....	220
Tableau 5.7	Evaluation de la probabilité de séparation du Proglumide par Analyse Factorielle Discriminante.....	221
Tableau 5.8	Evaluation de la probabilité de séparation du Bendroflumethiazide par Analyse Factorielle Discriminante.....	222

Introduction Générale

En 1884, Lord Kelvin met à jour la théorie pastoriennne en introduisant pour la première fois le terme de *chiralité*. Une entité moléculaire est chirale si elle se présente sous deux arrangements spatiaux, appelés énantiomères, non superposables à leur image dans un miroir. Depuis que la relation entre la structure moléculaire des énantiomères et l'activité biologique a été mise à jour, le domaine de la chiralité fascine toujours autant de scientifiques et est devenu un enjeu majeur dans de nombreux secteurs (santé, cosmétique, environnement et agrochimie).

Depuis la tragédie du Thalidomide, l'évaluation thérapeutique et toxicologique de chaque énantiomère est devenue une tâche indispensable lors du développement d'un médicament. C'est pourquoi, la commercialisation de principe actif énantiomériquement pur est privilégiée.

Parmi les approches permettant l'obtention de substances optiquement pures, la chromatographie en phase supercritique (SFC) est de loin la méthode la plus utilisée pour la discrimination des énantiomères. Cette technologie permet de couvrir une large gamme de problèmes séparatifs à travers l'optimisation des paramètres opératoires : nature de la phase stationnaire, composition de la phase mobile, température et pression. Il est important de souligner qu'une grande partie des expériences a été réalisée dans des conditions subcritiques. Cependant, le terme SFC a été utilisé comme un acronyme, définissant la technique plutôt que l'état du fluide.

En parallèle, le talon d'Achille des séparations chirales réside dans la faible compréhension du mécanisme de reconnaissance chirale. C'est pourquoi, les chromatographistes se contentent de screening afin de déterminer rapidement les conditions opératoires permettant la discrimination des deux énantiomères. Le développement de méthode chirale est d'autant plus difficile en raison de la multiplicité des phases stationnaires chirales (PSC) disponibles sur le marché.

Ce constat nous a d'abord conduits à mieux appréhender le paramètre le plus influent, la nature des phases stationnaires chirales. En effet, une procédure de caractérisation a été développée et est basée sur l'application de Relations Quantitatives Structure-Rétention (QSRR). Des relations mathématiques sont établies afin de corréliser des données

Introduction Générale

chromatographiques aux propriétés des molécules, de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Cette procédure décline la compréhension du mécanisme de reconnaissance chirale en deux volets : identifier les interactions qui gouvernent la rétention des énantiomères et déterminer les facteurs qui gouvernent le processus de séparation. Au-delà de l'amélioration de la compréhension du mécanisme, cette démarche rationnelle peut s'avérer utile pour la création d'une classification de phases stationnaires chirales en SFC (Chapitre II).

La procédure de caractérisation repose sur la mise en œuvre de conditions opératoires uniques et simples. Si la composition de la phase mobile a un impact significatif sur la qualité du processus énantiosélectif, pouvons-nous extrapoler nos premiers résultats dans des conditions expérimentales différentes ? Des travaux ont alors été entrepris pour appréhender les effets de la nature de la phase mobile sur les séparations énantiosélectives en SFC (Chapitre III).

La compréhension fragmentée du mécanisme représente également un verrou pour le transfert de méthodes développées initialement en chromatographie en phase liquide à polarité de phase normale vers la chromatographie en phase supercritique (Chapitre III).

Si le domaine de la chiralité se situe à l'interface de la chimie, de la physique et de la biologie, ce travail serait impossible sans l'application des outils d'analyse de données multivariées. Ils permettent de visualiser, classer, interpréter, transformer les données. Diverses chimies de PSC (polysaccharide, pirkle, glycopeptide macrocyclique, polymère synthétique) ont été cartographiées en termes de rétention et d'énantiosélectivité. Elles offrent un point de départ simple pour l'identification de systèmes orthogonaux (Chapitre IV).

Si les modèles mathématiques constituent un outil cohérent pour la description du processus énantiosélectif, qu'en est-il de leurs capacités prédictives ? La qualité des modèles développés sur un jeu d'estimation a été évaluée à l'aide d'une validation externe. Dans une dernière partie, nous vous présenterons les travaux entrepris pour répondre à cet ultime challenge (Chapitre V).

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Les fluides supercritiques et leur emploi en chromatographie

1. Historique

L'existence d'un état supercritique fut mise en évidence par un français, le Baron Cagniard de la Tour en 1822 lors de ses études portant sur l'action simultanée de la chaleur et de la compressibilité sur divers liquides tels que l'eau ou l'alcool [1]. Il observe qu'à une certaine température, une bille métallique placée dans une enceinte remplie d'alcool se déplace sans résistance. Cet état de la matière est qualifié d'« état particulier ». En 1859, les travaux de Mendeleïev sur l'expansion thermique des fluides permettent de définir la « température d'ébullition absolue », température au-dessus de laquelle un gaz ne peut être liquéfié par simple compression [2]. En 1869, Thomas Andrews confirme l'existence d'une isotherme critique, ainsi qu'une continuité entre l'état liquide et vapeur en étudiant les transformations du CO₂. En 1879, le pouvoir solvant des fluides supercritiques fut étudié par Hannay et Hogarth qui observent une solubilité élevée de sel d'iodure de potassium dans l'éthanol supercritique ($T_C = 243^{\circ}\text{C}$ et $P_C = 63$ bar) et d'une précipitation de ce dernier à partir du fluide homogène, liée à une réduction de la pression [1].

Ce n'est qu'à partir des années 1970 que la technologie des fluides supercritiques sera réellement exploitée par le monde industriel. Un grand nombre de brevets déposés est relatif à l'extraction par fluide supercritique. La première application d'extraction a été décrite en Allemagne dans le cadre de la décaféinisation, l'extraction de la caféine des graines de moka. L'extraction supercritique de substances fragrances caractéristiques dans des feuilles de tabac a également été détaillée [3]. Dans le domaine de la pétrochimie, un procédé supercritique mettant en jeu un mélange de propane et de propylène industriel (373 K, 11 MPa) permet le désasphaltage des résidus pétroliers [3]. Dans le nucléaire, les déchets organiques radioactifs sont détruits par un procédé d'oxydation hydrothermal qui repose sur l'exploitation de l'eau dans le domaine supercritique [4].

En 1958, l'utilisation du fluide supercritique (FS) comme phase mobile chromatographique a été proposée par Lovelock. Klesper l'appliquera deux ans plus tard pour

la séparation de porphyrines thermolabiles en utilisant du chlorofluoromethane comme FS et un système HPGC « *high-pressure gas chromatography* » [5,6].

2. La chromatographie en phase supercritique de nos jours

2.1. Définitions

Tout composé pur existe sous trois états de la matière : solide, liquide et gazeux, en fonction de la température et de la pression. Au point triple, les trois états de la matière coexistent en équilibre. Les domaines d'existence des différents états sont délimités par des courbes d'équilibres qui traduisent des transitions de phase (fusion/solidification, vaporisation/liquéfaction, sublimation/condensation).

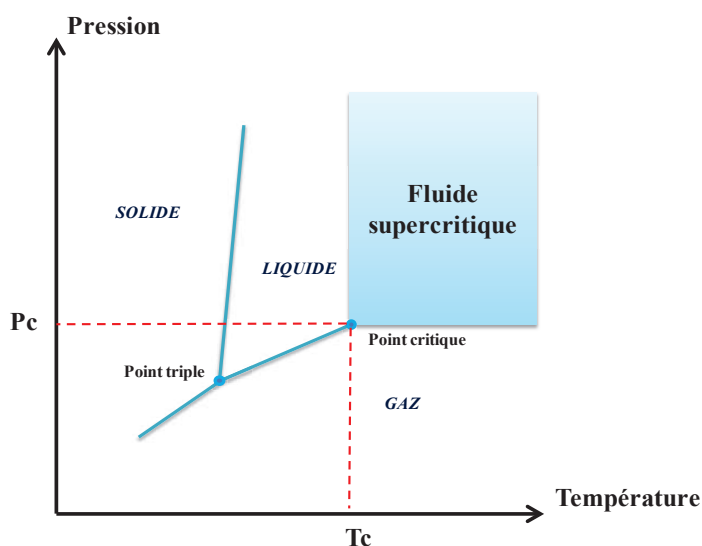


Figure 1.1 : Diagramme de phase d'un corps pur

La définition de l'état supercritique est liée à l'équilibre liquide-vapeur du diagramme de phase (Figure 1.1). Au point critique, la densité des deux phases tend vers l'égalité, faisant ainsi disparaître toute interface. La figure 1.2 illustre le processus de disparition de l'interface au point critique pour un composé pur. De la gauche vers la droite, on assiste au passage d'un système biphasique distinct liquide/vapeur à la formation d'une phase supercritique unique homogène au point critique. Ce phénomène est lié à une élévation de pression et de température.



Figure 1.2 : Evolution de l'interface biphasique liquide/vapeur due à une augmentation des paramètres thermodynamiques (P, T) jusqu'au point critique (<http://www1.chem.leeds.ac.uk/People/CMR/criticalpics.html>)

De manière générale, l'état supercritique est un état de la matière, intermédiaire entre les gaz et les liquides, qui est atteint lorsque les valeurs de pression et de température sont supérieures à celles des paramètres critiques (P_C , T_C).

2.2. Les fluides supercritiques – Le dioxyde de carbone

2.2.1. Caractéristiques générales

La table 1.1 rapporte les paramètres critiques de composés pouvant être utilisés à l'état supercritique. Le choix du fluide va dépendre de la problématique rencontrée.

	T_C (°C)	P_C (bar)
Dioxyde de carbone	31	74
Eau	374	221
Xénon	17	58
Propane	97	43
Méthanol	133	114

Tableau 1.1 : Paramètres thermodynamiques de certains fluides supercritiques [7]

Ainsi, des alcanes (propane ou fluoropropane) sont injectés à haute pression dans la roche pour en accroître la perméabilité et faciliter l'extraction des hydrocarbures non conventionnels, comme les gaz et pétrole de schiste [3]. Dans le domaine cosmétique, le couplage off-line d'un système d'extraction en eau subcritique et d'un système SFC permet l'étude des flavones dans les peaux d'orange [8]. Le Xénon, quoique relativement cher, est utilisé en spectroscopie, en raison de sa transparence en IR. L'utilisation de certains fluides est limitée de par les risques qu'ils génèrent. C'est le cas du protoxyde d'azote, N_2O , dont les

risques d'explosion en présence de composés organiques sont élevés [9]. Le CO₂ en tant que FS est une alternative de substitution aux solvants organiques dans le nettoyage de précision pour les composants électriques et électroniques (société Autoclave Engineers) ou l'application des peintures (procédé Unicarb®). Il peut également être utilisé pour la décontamination bactérienne (bactéries, spores, champignons) des denrées alimentaires. La stérilisation est alors rapide et emploie des températures relativement faibles permettant ainsi de conserver les propriétés nutritionnelles des aliments [10]. De plus, le CO₂ est devenu un solvant de choix, de par la combinaison de multiples avantages :

- Ses paramètres thermodynamiques sont relativement bas ($T_C = 31^\circ\text{C}$ and $P_C = 74 \text{ atm}$). En effet, ils facilitent la mise en œuvre de procédé à basse température, minimisant les risques de dégradation thermique.
- Il n'est pas toxique, non inflammable, inodore, chimiquement inerte et non corrosif. Certains fluides comme l'eau ou l'ammoniac sont à éviter pour ne pas endommager les systèmes.
- D'un point de vue économique, le CO₂ est produit en grande quantité, étant un sous-produit de la formation de l'hydrogène à partir du méthane lors de la fabrication de l'ammoniac. Il est relativement peu coûteux et disponible en haute pureté.

2.2.2. Polarité du CO₂

La polarité d'un solvant peut être estimée par le paramètre de solubilité d'Hildebrand δ . Dans le cas des fluides supercritiques, l'équation de Giddings [11] est utilisée :

$$\delta = 1,25 + \sqrt{P_C \frac{\rho}{\rho_l}} \quad (1.1)$$

pour laquelle P_C est la pression critique qui caractérise l'énergie moléculaire de cohésion du fluide (exprimé en atm), ρ correspond à la masse volumique du fluide à une pression donnée, ρ_l à la masse volumique à l'état liquide sous 1 atm alors que le rapport correspond à son état physique.

Dans le domaine supercritique, la polarité du CO₂ se situe entre celle du chloroforme et d'un alcane. Sa constante diélectrique, qui représente également la polarité d'un solvant, est

inférieure à celle des alcanes pour des densités comprises entre 0,6 et 1. Il est alors souvent considéré comme un solvant peu polaire ou apolaire. Pendant longtemps, son utilisation a été cantonnée à l'analyse de composés apolaires. Cependant, il est important de ne pas sous-estimer les capacités d'interaction du CO₂. En effet, bien qu'il ne possède pas de moment dipolaire permanent, la présence d'un moment quadripolaire permet l'existence d'interactions électrostatiques. En chromatographie, l'utilisation d'un co-solvant (ou « modificateur ») modifie le comportement thermodynamique du fluide et permet d'ajuster la force d'élution du fluide. De l'hexane au méthanol en passant par l'isopropanol ou le chlorure de méthylène, les applications des mélanges supercritiques CO₂-solvant couvrent un panel de molécules plus large. Aujourd'hui les composés polaires [12] et ioniques [13] sont susceptibles d'être analysés en CO₂ supercritique en adaptant la nature du modificateur.

2.3. Des propriétés particulières

Le FS a des propriétés intermédiaires à celles d'un état ordonné (liquide) et dispersé (gaz). D'une part, une faible viscosité et une diffusivité élevée, proches de celles des gaz, favorisent le processus de transfert de masse. D'autre part, une masse volumique proche de celle des liquides, leur confère un bon pouvoir solvant. La table 1.2 recense les caractéristiques des FS:

	Densité (g.cm ⁻³)	Viscosité (s.cm ⁻¹)	Diffusivité (cm ² .s ⁻¹)
Gaz	10 ⁻³	1 – 5.10 ⁻⁵	1 – 3.10 ⁻⁵
Fluide supercritique	0,2 - 0,5	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	10 ⁻⁸
Liquide	0,6 – 1,6	10 ⁻²	<10 ⁻⁵

Tableau 1.2 : Propriétés physiques des gaz, liquide et fluide supercritique [14]

2.3.1. Viscosité

La viscosité et la diffusivité des fluides supercritiques sont proches de celles des gaz. Une viscosité relativement faible induit une faible résistance à l'écoulement de la phase

mobile au travers de la phase stationnaire, se traduisant alors par de faibles pertes de charge. Ce paramètre régit également la vitesse de diffusion des solutés dans la phase mobile. Une diffusivité plus importante que celle des liquides favorise le transfert de matière et ainsi autorise l'utilisation de débits élevés, sans nuire à l'efficacité de la séparation [15].

A travers ces propriétés, la chromatographie employant les fluides supercritiques comme phase mobile s'impose comme une méthode alternative à la chromatographie liquide à ultra-haute pression (UHPLC), la chromatographie liquide haute température (HTLC) et à l'utilisation de colonnes monolithiques et à porosité superficielle pour le développement de procédures analytiques rapides et efficaces [16]. L'application de débits élevés (pouvant atteindre 10 ml/min) et de gradient de composition de phase mobile, ainsi que l'équilibrage rapide des colonnes permettent à la SFC de se positionner comme technique de choix dans le cadre de criblage rapide.

La faible viscosité des FS facilite également le couplage de colonnes, soit de nature identique pour accroître les performances de séparation, soit de nature différente pour bénéficier des sélectivités propres à chaque phase. Des efficacités importantes, de l'ordre de 200 000 plateaux peuvent être atteintes avec des longueurs de colonne atteignant 2 mètres [17]. Le développement de particules à faible diamètre (1,7 μm - 3,0 μm) autorise un nombre de plateaux similaires à ceux obtenus en UHPLC, ainsi que la réduction du temps d'analyse [18,19]. C'est également le cas des particules à porosité superficielle, appelées plus communément fused-core ou core-shell. Elles permettent notamment le couplage de colonnes car elles génèrent moins de pressions que les particules totalement poreuses [20].

Par exemple, le couplage en série d'une phase achirale (Synergi Polar RP 250 x 4,6 mm ; 4,0 μm) et chirale (Chiralpak ID 150 x 4,6 mm ; 5,0 μm) permet la séparation sélective de 4 herbicides racémiques (figure 1.3). L'intérêt est réel puisque les phases chirales présentent souvent une faible sélectivité achirale. La position et la longueur des colonnes ont un impact significatif sur la qualité de la séparation. Le couplage induit une augmentation de pression interne dans la colonne placée en première position, ce qui y augmente la force éluante du fluide. On peut observer dans la figure ci-dessous que l'inversion de la position des colonnes entraîne une perte de séparation entre les quatre premiers énantiomères. Ce phénomène est moindre dans le cas des colonnes monolithiques. La combinaison de

macropores et de mésopores permet d'atteindre une porosité de l'ordre de 80%. La grande perméabilité de la phase minimise les changements de densité du fluide [21].

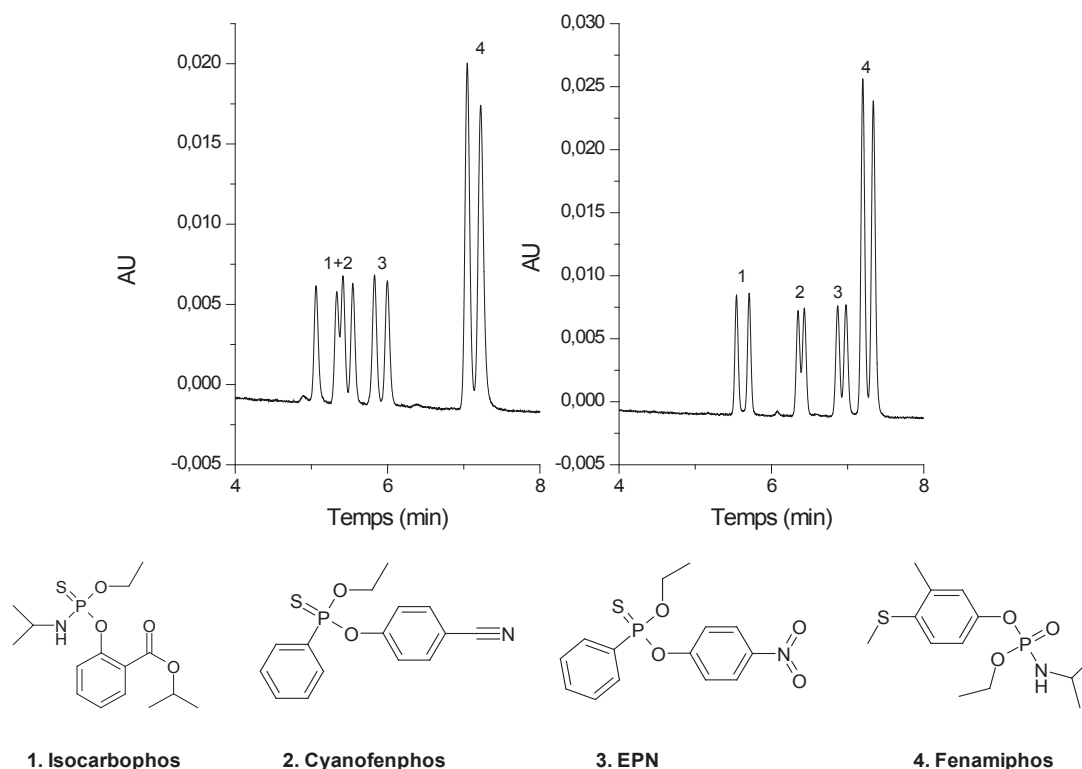


Figure 1.3 : A gauche couplage Chiralpak ID- Synergi Polar RP. A droite, couplage Synergi Polar RP- Chiralpak ID. Analyse de 4 pesticides sur le système Acquity UPC² : MeOH/EtOH (50 :50) dans CO₂, gradient 2% à 10% en co-solvants, débit : 3 ml/min, température : 55°C, pression de sortie : 105 bars, λ : 244 nm (résultats non publiés).

2.3.2. Pouvoir solvant

Les fluides supercritiques ont un pouvoir solvant dit à « géométrie variable », ces propriétés pouvant être modulées par une variation des paramètres thermodynamiques (pression et température), c'est-à-dire en faisant varier leur densité.

Le pouvoir solvant du CO₂ supercritique peut également être modulé par l'ajout de modificateurs tels que le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol ou l'acétonitrile [22]. Généralement, ils améliorent la solubilité des composés polaires ainsi que les performances chromatographiques. Sauceau *et al.* (2001) montrent par exemple que la solubilité d'un principe actif pharmaceutique dans le CO₂ peut être multipliée par 10 avec 1% de DMSO ou 5 % d'éthanol [23,24]. Ils peuvent aussi apporter de nouvelles propriétés aux FS. C'est le cas du

(R)-butanol pour apporter de la chiralité et le phosphate de tri-butyle pour augmenter la solvation des complexes métalliques [25].

L'adsorption du modificateur et du dioxyde de carbone sur la phase stationnaire peut altérer le caractère de la phase stationnaire. Sur les colonnes de silice greffée C18, ils recouvrent probablement les silanols résiduels, favorisant alors la symétrie des pics [26]. Dans le cas des phases stationnaires chirales polysaccharides, des modificateurs encombrés (comme l'isopropanol) peuvent altérer la liaison glycosidique entre les unités de glucose, induisant une modification de la structure tridimensionnelle du polymère [27].

L'ajout de modificateur se répercute également à un autre niveau. En effet, un accroissement de viscosité du fluide est observé ce qui induit une augmentation de pression interne et donc de la masse volumique. Les paramètres critiques sont également augmentés lors de l'introduction d'un co-solvant.

Dans les zones de forte compressibilité, un faible changement de pression induit une augmentation considérable de la masse volumique et donc du pouvoir solvant. La vitesse linéaire de la phase mobile et la compressibilité du fluide sont continuellement modifiées le long de la colonne. Toute instabilité dans le contrôle de la pression conduit à une diminution de l'efficacité de la séparation, une modification de la sélectivité [28,29] ou même à des résultats non reproductibles.

Afin de minimiser l'influence de la pression et de la température, il est possible de travailler dans le domaine « subcritique » pour lequel la valeur d'un des paramètres est plus faible qu'un paramètre critique ($P < P_C$ ou $T < T_C$). Tarafder *et al.* ont discuté de l'effet de la pression et de la densité en milieu sub- et super-critique. Ils recommandent d'opérer dans des conditions de faible compressibilité du CO₂ (haute pression et faible température) afin d'éviter une variation des propriétés thermo-physiques de la phase mobile le long de la colonne et une mauvaise efficacité [30]. Cet état permet d'apporter une flexibilité dans le contrôle du processus de rétention.

Il existe actuellement une multitude de termes, regroupée sous le terme « *chromatographie unifiée* » [31] pour désigner l'état du fluide en fonction des conditions de pression et de température, ainsi que de la composition de la phase mobile : l'état « *near critical* » (subcritique) est atteint lorsque la valeur de pression ou de température est inférieure à un des paramètres critiques. L'état « *superheated liquid* » (liquide superchauffé) est atteint

lorsque $P < P_C$ et $T > T_C$. Par exemple, l'extraction d'herbicides des sols est réalisée à l'aide d'eau à haute température (374°C) [32]. Des études ont aussi été menées concernant des phases mobiles liquides pour lesquelles la viscosité est moindre via une augmentation de température ($< 100^\circ\text{C}$). L'utilisation de ces liquides dits « à fluidité améliorée » (« *enhanced fluidity liquids* ») induit des temps d'analyse réduits, une efficacité plus importante, ainsi qu'une réduction de la perte de charge le long de la colonne [33]. Ils sont une alternative intéressante aux phases liquides conventionnelles.

3. Applications

3.1. Applications industrielles du CO_2 supercritique

Le potentiel du CO_2 supercritique est reconnu et exploité dans le monde industriel et offre une variété d'applications : son utilisation comme **solvant d'extraction ou de fractionnement** devient une alternative intéressante vis-à-vis des techniques d'extraction conventionnelles telles que la macération ou la percolation. Ce procédé respectueux de l'environnement permet alors l'obtention d'extraits sans résidu de solvant. De par son caractère non polaire, le CO_2 supercritique est principalement utilisé pour l'extraction d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), de polluants aromatiques organochlorés (PCB) et de pesticides [34,35]. Dans le domaine agroalimentaire, son utilisation est surtout connue pour la décaféinisation [11] et/ou la purification d'arômes, dans la phyto-industrie, tels que la vanille, les baies de rose ou le houblon [1].

En 1985, la Société Separex, créée par Michel Perrut, devient spécialiste dans la mise en place de processus pour l'extraction végétale pour la pharmacie, cosmétique, nutraceutique.

Le Commissariat à l'énergie atomique (CEA) a mis au point un procédé innovant et breveté de décontamination du bouchon de liège par traitement CO_2 supercritique. Il permet d'éliminer sélectivement le 2,4,6-trichloro-anisole (TCA), ainsi que des micro-organismes, à l'origine des déviations organoleptiques du vin [36].

Il peut être aussi utilisé pour la valorisation de substances dans des matrices données. C'est le cas du procédé d'extraction du squalène à partir d'huile d'olive. Ce composé est utile dans le domaine alimentaire (complément alimentaire), cosmétique (antioxydant, antistatique et émollient) et pharmaceutique (anticancéreux).

Dans le domaine de la santé, le procédé RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) illustre l'utilisation du fluide supercritique comme solvant de pulvérisation dans le cadre du contrôle de la taille et la morphologie des particules [37]. Son principe repose essentiellement sur le pouvoir solvant du fluide. Ce procédé a été utilisé avec succès pour la formation de particules inhalables pour une administration pulmonaire [38].

Ce procédé peut être également employé pour étaler l'effet thérapeutique d'une substance active à l'aide de polymères biocompatibles. La lovastatine, molécule hypocholestérolémiante, est co-précipitée avec l'acide poly-lactique (PLA), sous forme de microsphères polymériques [39]. Aujourd'hui, la société française Ethypharm est spécialisée dans la mise au point de procédé d'encapsulation pour une libération contrôlée dans l'organisme. Les microsphères destinées à être administrées par voie injectable sont obtenues selon un procédé d'enrobage impliquant la mise en contact sous agitation du principe actif et de l'agent enrobant dans un fluide supercritique (brevet WO 2001089481 A1).

La société Pierre Fabre est le seul établissement pharmaceutique à disposer d'une plate-forme pour des études d'élaboration, d'imprégnation et d'enrobage de pré-formulations galéniques basées sur l'utilisation du CO₂ supercritique. Ces procédés permettent d'augmenter la biodisponibilité du principe actif.

3.2. *Approches chromatographiques*

Depuis sa naissance dans les années 1960, la chromatographie en phase supercritique (SFC) a été l'une des techniques orphelines des laboratoires analytiques, définie aussi bien comme une source de difficultés qu'un vaste champ d'opportunités.

Dans les années 80, la SFC est perçue comme une extension de la chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire et détecteur universel de type ionisation de flamme ou FID) et de la chromatographie liquide haute performance (système d'injection et contrôle de phase mobile). Cependant, le faible développement technologique, associé aux limitations

envisagées du domaine d'application et la mauvaise reproductibilité des analyses due à des appareils encore peu fiables restreignent alors son usage à l'industrie pétrochimique [40].

Dans les années 90, l'utilisation de la SFC sur colonne remplie, appuyée par les travaux de Terry Berger, connaît un regain d'intérêt [41]. La technique est alors considérée comme une alternative prometteuse à la chromatographie liquide à polarité de phase normale (NPLC). Les instruments sont des extensions des appareils utilisés en HPLC, avec des modules spécifiques complémentaires tels que le régulateur de pression qui permet de maintenir précisément le fluide à une certaine pression, la pompe réfrigérée qui permet de pomper le CO₂ sous forme liquide afin d'éviter les phénomènes de cavitation, et un système de détection adapté (cellule résistante à la haute pression pour la détection UV-visible).

La SFC est aujourd'hui souvent considérée, à tort, comme une technique de phase normale analogue à la NPLC en raison de la nature apolaire de la phase mobile. Les phases polaires silice, amino, cyano et diol sont les plus utilisées, mais toutes les chimies de phase stationnaires existant pour l'HPLC peuvent être employées. Un grand nombre de travaux a été publié par notre équipe sur la classification de ces colonnes en SFC. Parmi le large choix de chimie de phases stationnaires, ces travaux fournissent des lignes directrices pour sélectionner un set de colonnes complémentaires en termes de sélectivité [42-45]. Cependant, une même phase mobile peut être appliquée indépendamment de la nature de la colonne [46]. Des phases de type alkyl peuvent être employées pour des séparations de type « phase inverse » alors que inversement, des phases polaires peuvent être employées pour des séparations de type « phase normale ». Ceci est parfaitement illustré pour l'analyse de composés aromatiques en SFCxSFC compréhensive, mettant en œuvre deux colonnes de polarité opposée dans chacune des deux dimensions, une colonne de silice dans la première dimension permettant une séparation par classe et une colonne de silice greffée octadécyle (ODS) dans la deuxième permettant une séparation intra-classe [47].

A l'heure actuelle, la chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC) demeure la technique la plus utilisée pour les séparations achirales. Cette dominance s'illustre notamment par le grand nombre de caractérisations et de classifications dédiées aux colonnes apolaires de type ODS [48-50]. Les techniques SFC et RPLC en phase aqueuse sont orthogonales en raison du rôle prédominant de l'eau dans le mécanisme RPLC. Le couplage

bidimensionnel est un véritable avantage pour l'analyse de composés hautement hydrophobes [51]. Les triglycérides (TGs) sont les constituants majoritaires des huiles végétales et des graisses animales. La large diversité des chaînes d'acides gras des TGs fait que l'analyse monodimensionnelle est parfois insuffisante. Le couplage SFC x RPLC génère une capacité de pics élevée due au degré d'orthogonalité important entre les deux techniques [52].

Les phases stationnaires disponibles en HPLC peuvent toutes être utilisées en SFC. Cependant, certaines phases sont développées pour une utilisation spécifique à la SFC [18]. La phase 2-éthylpyridine a été introduite par Princeton Chromatography. Elle est notamment utile pour l'analyse de composés basiques qui représentent une part importante des principes actifs développés et commercialisés dans l'industrie pharmaceutique [53]. L'efficacité de cette colonne repose peut-être sur le ligand 2-éthylpyridine qui se comporte comme protection stérique vis-à-vis des silanols résiduels [54] ou l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires (silanol-azote de la pyridine) qui rend les silanols moins disponibles. Elle a maintenant été copiée par de nombreux autres fabricants de colonnes.

3.3. La SFC préparative

Lors du développement d'un candidat médicament (figure 1.4), la synthèse de la substance active peut résulter de voies de synthèses complexes. Isoler la molécule cible est primordial afin d'évaluer le profil pharmacologique, pharmacocinétique et toxicologique.

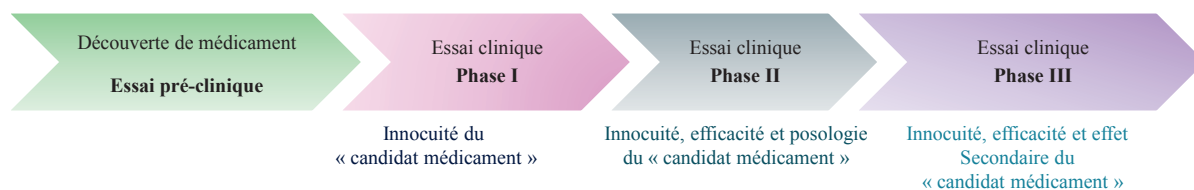


Figure 1.4 : Les différentes phases des essais cliniques

Diverses techniques sont disponibles et dépendent du profil d'impureté, de la solubilité de l'échantillon, de la sélectivité et des quantités à purifier, ainsi que de la productivité désirée : HPLC, SFC, SRR (*steady-state recycling*), SMB (*simulated moving bed*).

La chromatographie préparative « en batch » (injection/élution/collecte) a très vite été considérée comme un outil de support pour la synthèse, aux dépens de la cristallisation. En 1973, le chimiste R.B. Woodward déclare que « les méthodes de chromatographie liquide haute pression [...] seront indispensables dans les laboratoires de chimie organique dans le futur. » [55].

Elle peut constituer un axe parallèle à la synthèse asymétrique pour améliorer la pureté énantiomérique. Alors que la synthèse stéréosélective de cyclopropanation [56] permet d'obtenir 77% d'excès énantiomérique (e.e.), associée à la prep-SFC la pureté énantiomérique est nettement améliorée et devient supérieure à 99%.

En raison de l'automatisation des étapes d'injection et de collecte, des économies d'énergie (l'étape d'évaporation est moindre), de solvant et de retraitement des déchets, la chromatographie en phase supercritique est devenue rapidement la méthode de choix pour les applications de purification du milligramme à plusieurs kilogrammes. White reporte l'implantation de la prep-SFC, en parallèle de la prep-LC, pour l'évaluation de la pureté énantiomérique et la purification chirale chez Eli Lilly. Après 12 mois, 96% des purifications sont réalisées en prep-SFC au dépend de la prep-LC en raison de la forte productivité associée à une économie sur les coûts opératoires estimée à 40 000 dollars par an [57]. De plus, les caractéristiques intrinsèques du fluide supercritique (faible viscosité et haute diffusivité) permettent de satisfaire les besoins de productivité. A travers la faible viscosité du fluide, les débits élevés peuvent être employés sans atteindre les pressions limites du système et sans perte significative d'efficacité. De plus, alors qu'en HPLC de larges diamètres de particules sont utilisés pour minimiser l'effet de la pression, en SFC, une même granulométrie de particules peut être employée aussi bien en analytique qu'en préparatif. Hamman et ses collaborateurs décrivent la purification de 100 mg de racémiques pharmaceutiques sur des phases stationnaires chirales (PSC) de dimensions 250 mm x 21,2 mm ; 5 μ m et un débit de 70 ml/min [19].

La SFC préparative repose aussi sur les avantages d'une purification « verte » en utilisant du CO₂ comme constituant majoritaire de l'éluant. Elle se place comme une solution pour remédier à l'utilisation de solvants organiques et diminuer les problèmes liés à l'élimination des déchets organiques.

Une des limitations de la prép-SFC concerne la solubilité des molécules d'intérêt dans le CO₂. La dérivation des fonctions amines à l'aide de groupement carbobenzyloxy facilite la solubilité et permet d'obtenir de hautes performances en termes de résolution [58]. L'utilisation de phases stationnaires plus résistantes (phases achirales greffées et phases chirales immobilisées) et de solvants moyennement polaires (tels que le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le THF) permettent de minimiser cet inconvénient.

D'autres technologies sont mises en œuvre pour la purification à grande échelle (supérieure à plusieurs kilogrammes). Le processus de chromatographie à lit mobile simulé (SMB) est un procédé continu qui a été introduit pour la séparation des xylènes et des sucres dans les années 90 [59]. Il est principalement employé pour un simple mélange d'énantiomères. La productivité obtenue est optimale en termes de produit purifié par volume de solvant. Ce procédé (figure 1.5) est basé sur l'adsorption différentielle des composants d'un mélange sur un solide poreux et emploie plusieurs colonnes en série. Il implique un mouvement simulé de la phase stationnaire (PS) et de la phase mobile (PM) dans des directions opposées. Ce mouvement est dû à la commutation cyclique des vannes d'alimentation, de l'extract, du raffinat et du désorbant dans le sens de l'écoulement de l'éluant.

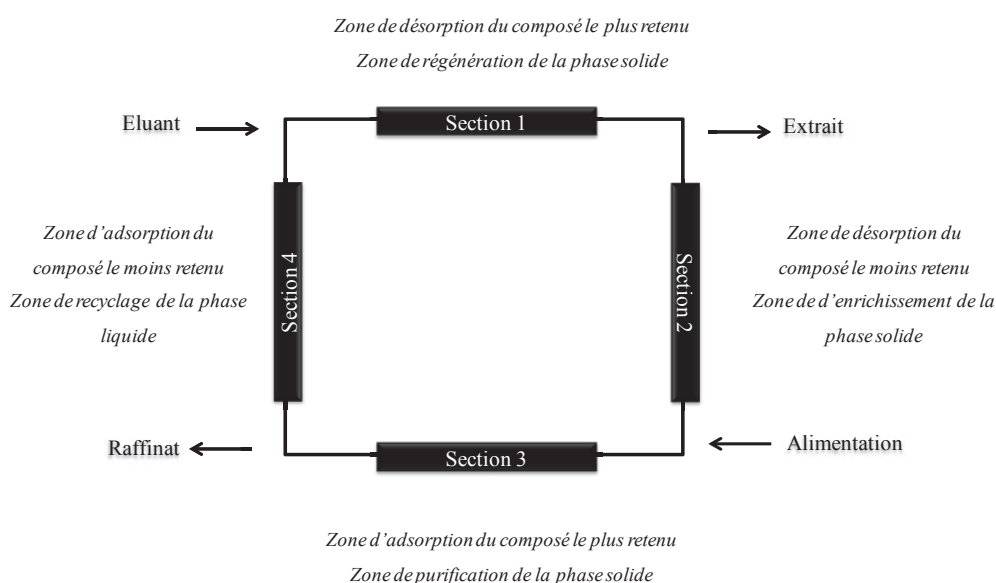


Figure 1.5 : Principe de la chromatographie à lit mobile simulé

Ce procédé est caractérisé par sa configuration, à savoir le nombre de colonnes dans chaque section. En fonction du degré de difficulté de la séparation, moduler la configuration permet d'attribuer une contribution plus ou moins importante à une des sections. L'utilisation des

caractéristiques intrinsèques des FS est attrayant dans le cadre du procédé SMB. La force éluante du FS peut être modulée dans les différentes sections de l'unité SMB dans le but d'obtenir des performances optimales. Denet *et al.* rapportent l'emploi du système SMB avec fluide supercritique (SF-SMB) avec une configuration 2/2/2/2 pour la purification d'intermédiaires pharmaceutiques et observent une nette amélioration des performances, en utilisant un gradient de pression.

4. Conclusion

Depuis son introduction en 1962 par Klesper, Corwin et Turner, la chromatographie en phase supercritique avec des colonnes remplies, a eu son lot de hauts et de bas. Le manque d'intérêt pour la SFC est, selon les experts, directement lié à l'ignorance de ces capacités.

"I'm doing SFC.

Oh, science fiction chromatography" [41]

Si autrefois, cela avait une connotation peu avantageuse, aujourd'hui, « science fiction chromatography » peut être assimilée à une conception futuriste et innovante de la SFC. La technique est devenue mature et couvre un large panel de molécules (actifs thérapeutiques, acides gras, pesticides, alcanes, fullerènes, carbohydrates, stéroïdes, produits naturels, métabolites) [60, 61].

Alors que la SFC est le berceau du domaine des séparations chirales dans l'industrie du médicament, elle reste dans l'ombre de sa parente l'HPLC et est boudée par le monde académique. La SFC est un parent pauvre de la recherche fondamentale.

Cependant, les scientifiques imaginent un avenir prometteur à la technique : les avantages du fluide supercritique et les avancées technologiques laissent penser qu'elle se suffit à elle-même pour résoudre toute problématique. Dans la lignée du proverbe « plus on est nombreux, plus on est fort », la chromatographie multidimensionnelle (SFC-LC et SFC-GC) permettrait d'ouvrir la porte à de nouvelles dimensions et d'étendre les performances de la technique (Larry Taylor, Virginia Tech) [60]. C'est une thématique qui doit être explorée, notamment en termes de compatibilité de phase mobile. Pour aller encore plus loin, une niche est ouverte au

profit de la miniaturisation des colonnes et des quantités de solvants nécessaire pour faire de la SFC une technique encore plus verte (Christopher Welch, Merck Research Laboratories) [60].

Depuis une vingtaine d'années, le nombre d'articles scientifiques relatant des analyses (achirales et chirales) en SFC est sensiblement similaire (avec une moyenne de 250 articles par an). Cependant, les analyses rapides, l'aspect préparatif et le coût sont trois facteurs qui poussent l'industrie pharmaceutique à utiliser cette technologie verte, notamment pour les purifications de mélanges racémiques (> 100 kg) au dépend des synthèses stéréosélectives dans les premières phases de développement d'un médicament. La SFC s'impose de plus en plus dans le parc analytique des groupes pharmaceutiques comme technique de choix pour l'obtention d'entités énantiomériquement pures ou la détermination de la composition énantiomérique.

II. La chiralité

1. Historique

Le concept de dissymétrie moléculaire a été suggéré implicitement très tôt par le philosophe Platon. A partir du XIX^{ème} siècle, ce sont les travaux conjugués de physiciens et chimistes qui ont conduit à la notion de chiralité, notamment ceux concernant l'optique ondulatoire. Arago (1811) découvre l'activité optique du quartz cristallin. Quelques années plus tard, Biot (1814) est le premier à établir une possible relation entre l'activité optique et la structure cristalline du quartz. Il généralise ces observations sur des solutions de substances organiques naturelles. Pasteur (1848) étudie la cristallisation d'un produit inconnu, alors appelé acide racémique (« *acide du vin* »), par Gay-Lussac. Ce composé présente la même composition que l'acide tartrique mais ne montre aucun pouvoir rotatoire. Pasteur parvient à séparer minutieusement les deux types de cristaux. En solution, ils font dévier le plan de la lumière polarisée d'un même angle et dans un sens opposé. Pasteur en déduit alors un arrangement spatial différent des atomes à l'échelle moléculaire et met en évidence la relation entre l'activité optique et l'asymétrie de la molécule [62]. Cette découverte est ensuite renforcée par les travaux de Le Bel et Van't Hoff (1874) qui établissent la structure tétraédrique du carbone dans les composés organiques saturés. En 1884, Lord Kelvin met à jour la théorie pastoriennne lors d'une conférence à Baltimore en introduisant pour la première fois le terme de *chiralité* [63] :

“J'appelle chiral toute figure géométrique ou tout ensemble de points qui n'est pas superposable à son image dans un miroir. Je parle alors de chiralité.”

2. La stéréochimie

2.1. Définition

La stéréochimie relie quatre concepts de base pour étudier les propriétés liées à la géométrie des édifices moléculaires :

- la *composition* précise et dénombre les atomes,

- la *constitution* précise la nature et les modes de connexion des atomes formant une entité moléculaire,
- la *conformation* et la *configuration* sont étroitement liées à la disposition spatiale des atomes.

La configuration permet de distinguer les structures stéréoisomères et d'établir les relations d'énantiomérisie et de diastéréoisomérisie. Une entité moléculaire est chirale si elle se présente sous deux arrangements spatiaux, appelés énantiomères, non superposables à leur image dans un miroir (figure 1.6).

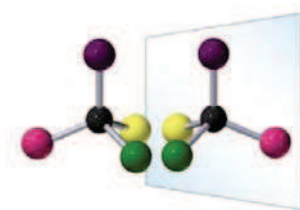


Figure 1.6 : entité moléculaire chirale, non superposable à son image spéculaire

Une molécule ayant n centres stéréogènes présente 2^n stéréoisomères. L'inversion d'un des centres stéréogènes induit la formation de stéréoisomères, appelé diastéréoisomères, non superposables et non objet-image l'un de l'autre (figure 1.7).

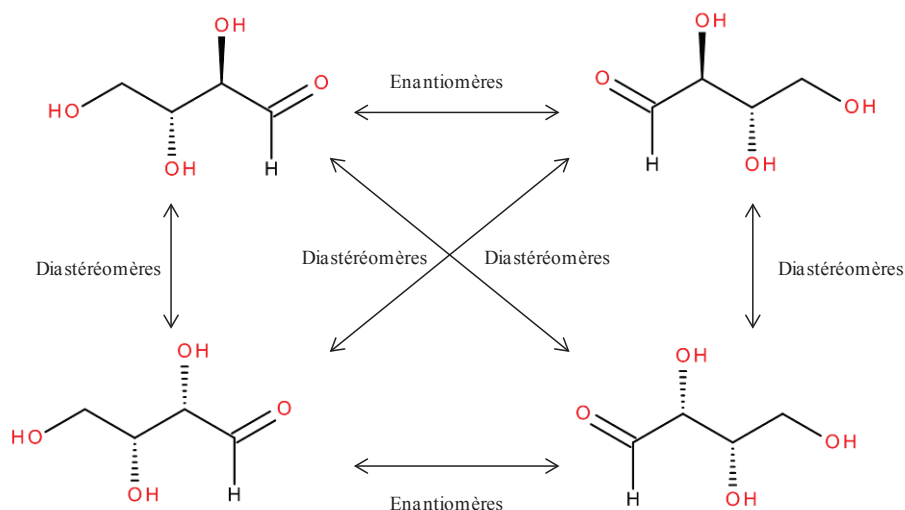


Figure 1.7 : Stéréoisomères du 2,3,4-trihydroxy-butanal [64]

On distingue différents éléments structuraux responsables de la chiralité d'une molécule : un *centre stéréogène*, un *plan de chiralité*, un *axe de chiralité*, une *hélice*. Mais il

est important de garder à l'esprit que la chiralité dépend étroitement de l'absence d'axe de symétrie S_n . L'élément stéréogène le plus communément rencontré est le carbone asymétrique (flurbiprofen ; Fig. 1.8), entouré de quatre substituants différents au sommet d'un tétraèdre. On retrouve ce type de coordination pour le silicium, le phosphore (isocarbophos ; Fig. 1.8), l'étain, le plomb et le germanium. Dans le cas de l'azote (base de Tröger ; Fig. 1.8) et du soufre (oméprazole ; Fig. 1.8), ils adoptent une structure pyramidale avec trois substituants différents et un doublet électronique non liant.

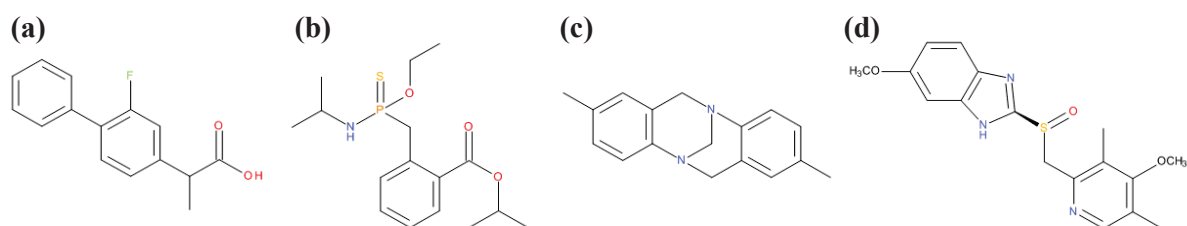


Figure 1.8 : Exemples de molécules chirales liées à la présence d'un centre stéréogène. (a) flurbiprofen, (b) isocarbophos, (c) base de Tröger, (d) oméprazole.

Dans d'autres cas, la chiralité est compatible avec la présence d'axe de symétrie, comme dans le cas des allènes (Fig. 1.9a). Les alcènes cycliques, les cyclophanes et les métallocènes ont quant à eux un plan de chiralité. Enfin la chiralité peut se traduire par l'hélicité, comme dans le cas de la structure de notre matériel génétique ou l'empêchement de la rotation autour d'une simple liaison (atropisomérisation ; Fig. 1.9b).

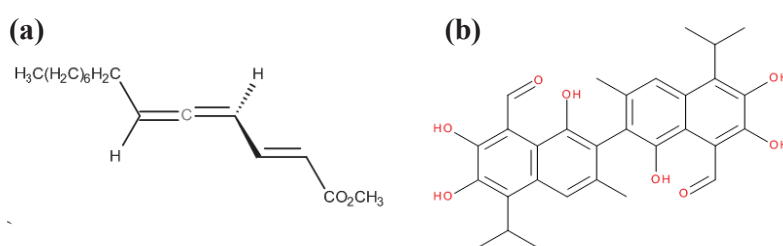


Figure 1.9 : Exemples de molécules chirales liées à la présence d'un axe de symétrie (a) Phéromone de la bruche du haricot chirale, (b) Le Gossypol

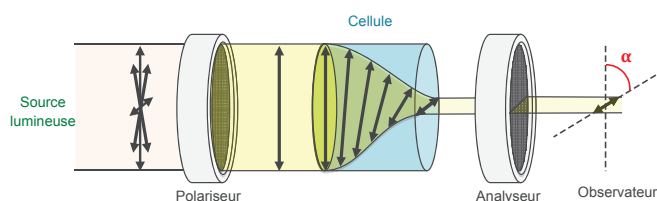
2.2. Propriétés

Dans un environnement symétrique, deux énantiomères ont des propriétés physiques et chimiques identiques (points de fusion et d'ébullition, pK_a), à l'exception du pouvoir

rotatoire. Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée plane traverse une solution d'un énantiomère pur, le plan de polarisation effectue une rotation, et le composé est dit optiquement actif (voir encadré 1). L'angle de rotation peut être mesuré à l'aide d'un polarimètre. Si la rotation de la lumière se fait dans le sens horaire alors la molécule est dite dextrogyre (+). Dans le cas contraire, elle est dite lévogyre (-).

Encadré 1 : excès énantiomérique

La mesure de l'excès énantiomérique (ou mesure de la pureté optique) peut être réalisée à l'aide de :



- La polarimétrie, basée sur la capacité des molécules chirales à faire dévier la lumière incidente polarisée d'un angle α . Le pouvoir rotatoire est défini par la loi de Biot :

$$\alpha = [\alpha] \cdot LC$$

pour laquelle $[\alpha]_T^\lambda$ représente le pouvoir rotatoire spécifique, L (dm) représente la longueur de la cuve et C (g/mL) est la

concentration de la solution. Les énantiomères d'une molécule chirale qui dispose d'un centre stéréogène, présentent des valeurs de pouvoirs rotatoires spécifiques de valeurs absolues identiques mais de signes opposés. Après avoir identifié le pouvoir rotatoire spécifique d'une entité énantiomériquement pure, il est possible de déterminer l'e.e d'un mélange :

$$ee = \frac{[\alpha]_{\text{mélange}}}{[\alpha]_{\text{pur}}}$$

Cette méthode est relativement simple et présente l'avantage d'analyser directement les énantiomères, comparée aux méthodes décrites ci-dessous. Cependant, elle présente les inconvénients suivants (i) disponibilité de la substance pure et (ii) l'incertitude de la mesure pour des valeurs faibles.

- La spectroscopie RMN est un outil de routine dans les laboratoires de synthèse. Cette méthode requiert la formation d'un complexe diastéréoisomère. Les agents chiraux de dérivation (réactif de Mosher) forment des complexes covalents avec le substrat. La discrimination repose alors sur la différence de déplacements chimiques. Au contraire, les agents chiraux de solvation établissent un complexe non covalent et la discrimination repose sur la différence entre les constantes d'association des isomères avec l'agent chiral de solvation. La mesure de l'excès énantiomérique en RMN fournit des résultats moins précis que les techniques chromatographiques avec des incertitudes pouvant atteindre 5% [65].
- Les techniques séparatives (chromatographiques ou électrophorétiques) requièrent la formation de complexes diastéréoisomères labiles soit par l'action d'un agent chiral de dérivation soit en présence d'une phase stationnaire chirale (pour plus de détails voir partie III de ce chapitre). On considère que l'intégration des pics correspondant à chaque énantiomère est proportionnelle à la quantité de chaque entité dans le mélange car la réponse physique d'un détecteur non chiroptique est identique pour les deux énantiomères. L'article, annexe 3, fait référence à la détermination de la pureté énantiomérique de la provitamine B5 dans les formulations cosmétiques en SFC à l'aide d'une double détection.

2.3. Nomenclature

2.3.1. Configuration absolue

Le sens de déviation du plan de polarisation ne présume en rien de la répartition des atomes dans l'espace. Le système universel de Cahn, Ingold et Prelog (CIP) est basé sur les règles de priorité des substituants portés par le centre stéréogène. Il permet de déterminer la configuration absolue en attribuant la chiralité R (*rectus*, arrangement dans le sens des aiguilles d'une montre) ou S (*sinister*, arrangement inverse) [66].

2.3.2. Cas particulier des glucides et des acides aminés

Le système de Fischer emploie la nomenclature D (Dextrogyre) et L (Levogyre). C'est un symbolisme analogique, généralement lié à la configuration des glucides et des acides aminés. Le glycéraldéhyde (figure 1.10) est l'exemple le plus communément décrit pour utiliser la convention de Fischer.

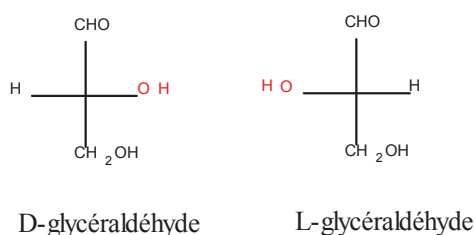


Figure 1.10 : Projection de Fischer du glycéraldéhyde

Selon la projection de Fischer : les traits verticaux correspondent à des liaisons en-dessous du plan alors que les traits horizontaux correspondent à des liaisons au-dessus du plan. La fonction la plus oxydée est placée en haut, les oses dont l'hydroxyle porté par l'avant-dernier carbone est à droite et sont de la série D.

Similairement, dans le cas des acides aminés, le groupe amine -NH_2 porté par le carbone en haut de la chaîne renseigne sur la nomenclature D et L (figure 1.11).

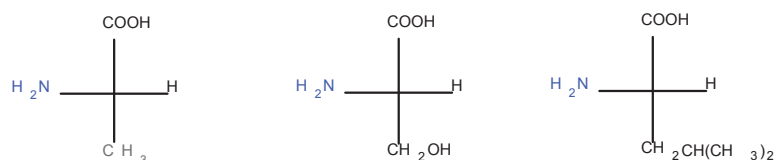


Figure 1.11 : Configuration L des acides aminés de gauche à droite : L-alanine, L-sérine, L-leucine

3. Chiralité et chimie du vivant

Le concept de dissymétrie moléculaire a très vite été associé à la chimie du vivant. Les molécules chirales de synthèse sont à 90% faites à partir du chiral pool (ensemble des molécules chirales d'origine naturelle). La Nature qui nous entoure possède sa propre signature et l'homochiralité qui la caractérise a fasciné plus d'un scientifique. En 1886, l'Italien chimiste Piutti isole les deux formes énantiomériques de l'asparagine et met en évidence une différence de goût, la forme (+) étant sucrée alors que la forme (-) est insipide. Piutti est alors le premier à établir la relation entre la structure moléculaire et l'activité biologique. Cette découverte a ouvert la voie aux études concernant la stéréospécificité des récepteurs biologiques et les mécanismes de transduction du signal cellulaire pour le traitement de maladies telles que l'obésité, le diabète et l'hyperlipidémie, liées à la consommation de sucre [67].

La prédominance des acides aminés de configuration L, au profit de la configuration D a un rôle primordial en biochimie et en physiopathologie. La stéréospécificité des récepteurs gustatifs est illustrée par l'exemple de l'aspartame, dipeptide méthylé provenant de la synthèse d'acide aspartique et de phénylalanine. Cette molécule présente un pouvoir sucrant 150 fois supérieur à celui du sucre. C'est l'isomère L-L qui, commercialisé, présente un goût sucré alors que la forme D-D est amère (figure 1.12).

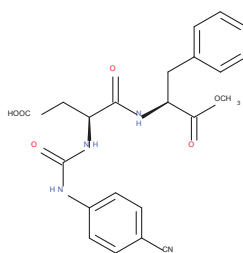


Figure 1.12 : Structure du L-Aspartyl-L-phénylalanate de méthyle

Dans le domaine de l'agroalimentaire, la présence de D-acides aminés dans le lait cru est un signe de prolifération bactérienne. La détection du (E)-5-méthylhept-2-en-4-one, reconnu comme principale saveur des noisettes, est un signe d'authenticité des huiles comestibles [68]. Dans le cas de l'huile de rose, l'authenticité est déterminée par la présence de (S)-(-)-citronellol, *cis*- et *trans*-oxyde de rose [69].

En archéologie, la mesure du degré de racémisation d'acides aminés spécifiques peut fournir une méthode de datation. L'âge de coquilles fossiles peut être estimé en évaluant le rapport des isomères de l'isoleucine. L'estimation de la datation d'ossement fossiles provenant de sites préhistoriques du Sud de la France a été réalisé en suivant les taux de racémisation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique des protéines [70].

Dans le cas de la maladie des urines du Sirop d'Erable (MSUD), un déficit enzymatique empêche la dégradation de trois acides aminés ramifiés (Leucine, Isoleucine et Valine). La recherche de marqueur dans les urines permet de diagnostiquer ce trouble métabolique.

En 1908, Abderhalde et Muller découvrent des différences entre les deux formes de l'épinephrine en termes d'activités pharmacocinétique, physiologique, toxicologique et métabolique [71]. La stéréochimie est perçue comme un outil capital pour la recherche et le développement dans le domaine pharmaceutique.

4. Chiralité et domaine pharmaceutique

Considérer la stéréochimie dans le domaine pharmaceutique réside dans la prise de conscience douloureuse (voir encadré 2) qu'un racémique est un mélange de deux entités pharmacologiquement distinctes. Pendant longtemps, la plupart des principes actifs (PA) de médicament sont commercialisés sous la forme de racémique. Dans les années 80, le développement de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique et les avancées considérables dans le développement des techniques de séparation permettent la mise en place de nouvelles procédures dans le cadre de la régulation de composés chiraux. En 2001, le prix Nobel de Chimie distingue William Knowles, Barry Sharpless et Ryoji Noyori pour leurs

travaux portant sur les réactions d'hydrogénation et d'oxydation avec catalyse chirale. Ils ont démontré que les catalyseurs à base de métaux de transition permettent la formation d'une seule des deux formes optiques. En 1974, ces travaux ont largement contribué au développement, à l'échelle industrielle, d'un grand nombre de médicaments de synthèse. C'est le cas avec la synthèse énantiosélective de l'acide aminé L-DOPA utilisé dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson.

L'utilisation des deux énantiomères dans des proportions différentes a été envisagée. L'indacrinone illustre la présence des deux formes isomères dans des proportions non équivalentes. L'efficacité de ce médicament est liée à la forme dextrogyre, responsable de l'effet diurétique (augmentation de l'élimination d'eau) associée à la rétention d'acide urique, non favorable. La forme lévogyre, uricostique, permet de minimiser l'effet secondaire de l'eutomère. L'effet diurétique est alors optimal.

Encadré 2 : La tragédie du Thalidomide

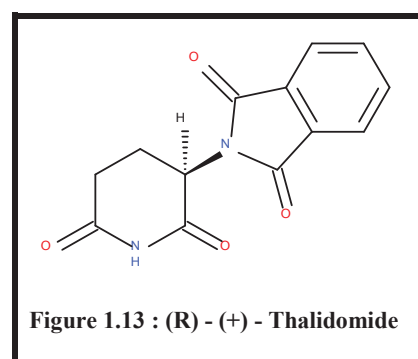
En 1957, la compagnie pharmaceutique Chemie Grünenthal met sur le marché un nouveau sédatif, substitut aux barbituriques. Conçue sous forme de racémique (R)-(+)-thalidomide (Fig. 13) et (S)-(-)-thalidomide, le médicament est commercialisé dans 46 pays sous différentes appellations (Contergan, Distaval, Quietoplex, Softénon, Talimol, Neurosedyn, Kevadon, Nibrol, Sedimide).

Il est constaté que l'exposition du fœtus au thalidomide durant le premier semestre de la grossesse devient une source d'invalidité d'un grand nombre de nourrissons (phocomélie, fente palatine, cécité) [72].

Des travaux ultérieurs, notamment ceux de Blaschke [73], ont permis de montrer l'effet tératogène de la forme (S)-(-)-thalidomide. Aujourd'hui, il est classé comme agent immunomodulateur. Outre l'aspect dramatique, cette affaire a mis en évidence la responsabilité médicale et pharmaceutique [74].

Le retour gagnant du Thalidomide ?

Le myélome multiple est un cancer incurable de la moelle osseuse. En dépit de la controverse, des études cliniques ont démontré une action efficace du Thalidomide sur cette hémopathie en permettant d'allonger la durée de vie des patients. Sa capacité à inhiber l'angiogenèse (la croissance des vaisseaux sanguins) stimulerait la réponse immunitaire au cancer et ralentirait la croissance des cellules cancéreuses [75].



Parallèlement, un débat international entre les autorités réglementaires et les industries pharmaceutiques a conduit à un consensus concernant le développement de médicaments chiraux. Des directives ont été publiées et sont disponibles pour l'Europe, les Etats-Unis et le Japon [76] afin de réguler le développement de produits chiraux en termes de qualité, sécurité et efficacité. Le développement de la forme active pure plutôt que le racémique, et inversement, doit faire l'objet d'une réflexion scientifique avant son autorisation de mise sur le marché (AMM) :

- Informer sur la synthèse de la substance active (*Chemistry of new active substances CPMP/QWP/130/96*) et le contrôle de la stabilité de la configuration. En effet, certaines entités sont sujettes à l'inversion chirale, étroitement liée à leur structure [77].
- Comprendre l'action d'un médicament, sa disponibilité et informer sur l'activité pharmacologique, le profil pharmacocinétique et toxicologique. Il existe un grand nombre d'exemples pour illustrer les différences entre les stéréoisomères en termes d'adsorption, de distribution, de liaisons aux protéines plasmatiques, de métabolisme hépatique et d'élimination rénale.

Depuis les années 90, le développement du nombre d'entités énantiomériquement pures est en hausse. Cette évolution s'accompagne d'une diminution drastique du développement de racémiques. Entre 1996 et 2003, la FDA a approuvé 48% d'énantiomères purs contre 36% de molécules achirales et 16% de racémiques. Le développement d'une forme énantiomérique pure à partir d'un racémique ou d'un mélange de diastéréoisomères qui a été approuvé et commercialisé au préalable est appelé plus communément la stratégie du « chiral switch » [78].

Des avantages potentiels peuvent découler de l'utilisation d'énantiomères purs tels qu'un profil pharmacocinétique moins complexe et plus sélectif, l'amélioration de l'indice thérapeutique en diminuant la source de variabilité, minimiser la toxicité des diastomères et diminuer la dose totale. La réévaluation de l'albuterol, utilisé pour soulager les bronchospasmes, révèle que l'utilisation de l'isomère seul, levoalbuterol, permet la suppression des effets secondaires, notamment cardiaques. De même, le racémique Dopa, utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson, est très souvent associé à divers symptômes tels que nausées, anorexie, diminution du nombre de granulocytes dans le sang.

Le « chiral switch » a permis l'introduction de la L-Dopa et la réduction d'effets adverses [79].

L'industrie pharmaceutique l'utilise comme stratégie afin de conserver son monopole d'exploitation sur un médicament donné et lutter contre l'industrie du médicament générique. En effet, la commercialisation de l'eutomère devient un véritable tremplin pour les médicaments dont les brevets tombent dans le domaine public. Par exemple, l'oméprazole est un anti-ulcère commercialisé par AstraZeneca sous le nom de Losec® et Prilosec®. En 1997, sa commercialisation a généré une recette d'environ 5 milliards de dollars. En 2002, la conversion du racémique oméprazole sous la forme (S) pure esoméprazole a permis aux laboratoires d'étendre leur protection de brevet, ainsi que leur marché d'exploitation [78]. Cette stratégie a également été appliquée au cas de l'ibuprofène, pour lequel la forme (R) présente *in vivo* une inversion rapide chirale. Aujourd'hui, le dexibuprofène ((S)-ibuprofène) est disponible en Allemagne, en Autriche (Seractil) et en Suisse (DesOprifène).

III. Les séparations énantiosélectives

1. Avant-propos

La régulation concernant l'utilisation de composés chiraux a induit un développement important de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique et des avancées considérables dans le domaine des techniques de séparation. Aujourd'hui, les méthodes non chromatographiques constituent une réelle alternative à la synthèse asymétrique : la **crystallisation sélective** est le procédé le plus employé dans l'industrie pharmaceutique. Elle repose sur une différence de solubilité des sels diastéréomériques. Par exemple, différentes méthodologies ont été appliquées pour isoler, à grande échelle, l'eutomère d'un composé du groupe AstraZeneca (Figure 1.14). En SFC, des problèmes de précipitation ont été rencontrés pour la résolution de 100 g de racémique, probablement dus à la faible solubilité du composé dans l'éluant supercritique. La résolution par cristallisation, à l'aide de l'agent optiquement pur (2S)-N-acetyl-leucine, a permis un rendement de 82% et un excès énantiomérique de 99% pour l'énantiomère désiré [80].

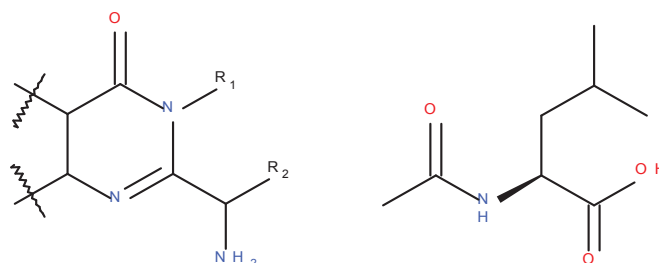


Figure 1.14 : L'intermédiaire de synthèse d'un principe actif chiral et son agent de dédoublement (2S)-N-acetyl-leucine

Des stratégies alternatives existent et sont basées sur des **procédés enzymatiques** (biotransformation), d'**extraction liquide-liquide** (LLE) ou l'utilisation de **membranes** et de **biocapteurs** [81].

Parmi les méthodes chromatographiques, on distingue :

- (i) la formation de diastéréoisomères en présence d'un agent chiral de dérivation, suivie de leur séparation sur un système non énantiosélectif. Bien que cette

approche soit simple et peu coûteuse car les colonnes chromatographiques achirales sont moins chères que les colonnes chirales, elle nécessite que le réactif soit d'une grande pureté et le retour à l'énantiomère pur peut être sujet à une racémisation partielle, une décomposition ou un dédoublement cinétique. De plus, la transposition à grande échelle est difficile.

- (ii) La formation labile de diastéréoisomères à l'aide d'un agent chiral dans la phase mobile est généralement utilisée en électrophorèse capillaire. Lin et ses collaborateurs rapportent la séparation de 54 énantiomères à l'aide de β -cyclodextrines, employées comme agent chiral de solvation en électrophorèse capillaire (EC) [82]. Des polysaccharides hydrosolubles (amylose et héparine) peuvent également être considérés et sont des additifs efficaces en EC [83]. La littérature compte aussi quelques exemples en SFC pour la séparation de β -adréno-récepteurs, *l'utilisation de cyclodextrines méthylées* [84] *ou de dérivés de proline comme agent chiral dans le fluide SC* [85].

La grande variété des additifs chiraux permet d'obtenir des taux de succès important. Cependant, même si cette approche convient parfaitement à des micro-systèmes tels que l'EC, elle n'est pas appropriée pour les séparations à grande échelle.

- (iii) L'emploi d'une phase stationnaire chirale (PSC) est aujourd'hui de loin la méthode la plus utilisée et repose sur la formation labile de diastéréoisomères à la surface de la phase énantiosélective. Le principal inconvénient de cette approche réside dans le coût des PSC à l'échelle préparative. Ce propos est à nuancer puisque si le coût d'investissement de PSC préparatives est important, il ne représente que 10% des coûts totaux sur le long terme. En revanche, le nombre de PSC est assez important et permet des développements de méthodes rapides et efficaces, ainsi qu'une transposition à l'échelle préparative

2. Les phases stationnaires chirales

2.1. Généralités

L'essor de la chromatographie chirale lié à l'évolution des phases stationnaires chirales repose sur « les travaux de recherche de grands groupes tels que ceux de Davankov, Pirkle, Okamoto, Blaschke, Allenmark, Hermansson, Amstrong, Gasparrini, Francotte et Lindner » [86]. Le premier exemple de séparation chirale en pSFC (*pour packed column SFC ou SFC sur colonne remplie*) a été réalisé en 1985 par l'équipe de Caude et Rosset sur une phase stationnaire chirale (PSC) de type Pirkle. Aujourd'hui, environ 1780 phases stationnaires chirales sont décrites dans la littérature (http://chirbase.u-3mrs.fr/ChirBase_overview.html), dont environ 200 sont commercialisées.

Les PSC peuvent être regroupées en deux catégories en fonction de la structure du sélecteur chiral et de la manière dont le complexe diastéréomérique est formé entre l'énantiomère et le sélecteur chiral :

- **PSC indépendantes**, i.e. *type Pirkle, acide aminé, échange de ligands, cyclodextrines, éthers couronnés* correspondent à de petites molécules optiquement actives greffées sur un support de silice ou un gel de polymère. Par exemple, la quinine et la quinidine sont des alcaloïdes naturels présents dans l'écorce de la cinchona, arbuste d'Amérique du Sud. La quinine est utilisée principalement dans le cadre du traitement du paludisme. Ces entités peuvent être immobilisées sur un gel de silice via un groupement carbamate. Les PSC Chiralpak® QN-AX et Chiralpak® QD-AX (figure 1.15), développés par l'équipe de Lindner, sont des échangeurs d'anions faibles, spécialement conçus pour la séparation de composés chiraux acides [87].

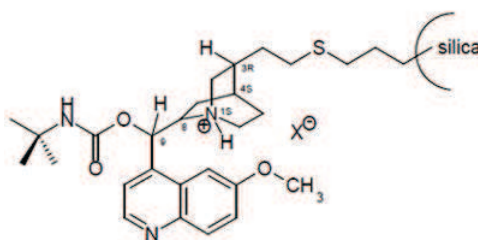


Figure 1.15 : Structure du sélecteur O-9-tert-butylcarbamate de quinine et quinidine Chiralpak QN-AX (8S, 9R) et Chiralpak QD-AX (8R, 9S), commercialisés par Daicel.

- **PSC coopératives** i.e. polymères (naturels et dérivés synthétiques) et les macromolécules d'origine naturelles sont hétérogènes et permettent généralement de résoudre une plus grande diversité de racémiques.

Cependant, la problématique réside dans le choix de LA colonne pour une molécule donnée. Usuellement, l'identification du sélecteur chiral approprié pour une paire d'énantiomères donnée requiert un nombre considérable d'expériences. Chaque couple de PSC et phase mobile (PM) sont testées individuellement. Ce screening correspond à un filtre permettant de déterminer rapidement la combinaison PSC/PM qui procure un point de départ satisfaisant, permettant de futures optimisations. Bien que ce soit une démarche simple, elle n'est scientifiquement et intellectuellement pas satisfaisante. Implémenter de nouvelles technologies dans le processus de sélection du système chromatographique permet de le décharger et de l'accélérer.

L'équipe de Christian Roussel a réalisé un travail de fourmis en collectant des informations structurales, chromatographiques et bibliographiques sur plus de 190 000 séparations chirales (dont 12 000 en 2013) en HPLC, SFC, GC, SMB...sous la forme d'une base de données CHIRBASE (http://chirbase.u-3mrs.fr/ChirBase_overview.html).

Certaines compagnies, telles que Phenomenex et Chiral Technologies (http://www.chiral.fr/products_method_development_service.asp), offrent à leurs clients des prestations de développement de méthodes chirales et mettent à leur disposition des notes d'applications.

Wang et ses collaborateurs ont proposé le couplage de trois PSC différentes de type macrocyclique glycopeptide connectées en série. Elles sont testées comme une seule et même colonne en utilisant des phases mobiles différentes. Bien que rapide, cette approche ne permet pas d'identifier la PSC responsable de la discrimination chirale. Un processus de déconvolution doit être réalisé avec une phase mobile donnée, ce qui rend l'approche difficile à automatiser [88].

Le screening de plusieurs colonnes en parallèle a été reporté dans la littérature. Le système Multiplex LC/UV/MS (MUX) de Waters permet l'analyse en parallèle sur 4 PSC [89] et le système SFC Sepmatix de Sepiatec GmbH (<http://www.sepiatec.com/products/sfc/sepmatix-8x-screening-sfc/>) permet un screening en parallèle sur 8 PSC. Une stratégie pour le screening de cinq PSC en parallèle avec une double détection UV et dichroïsme circulaire a été développée par l'équipe de Zhang. Elle permet un

gain de temps considérable : alors que le screening de 5 colonnes et 5 phases mobiles nécessitait 10h, le screening de colonnes en parallèle est réalisé en seulement 2h. De plus, le dichroïsme circulaire permet de suivre le signe de la chiralité et l'ordre d'élution des énantiomères [89].

La même équipe a proposé une variante de la démarche SMB avec la SMC (Simulated Moving Column). La SMC permet d'améliorer la séparation d'une paire d'énantiomères en allongeant virtuellement la longueur de la PSC. Coupler cette démarche avec les caractéristiques intrinsèques de la SFC (diffusivité et viscosité) permet de multiplier la longueur effective de la colonne d'un facteur 20 et améliorer la résolution chirale d'un facteur 5 tout en minimisant les phénomènes de diffusion [90].

La plupart des PSC développées initialement en LC sont employées en SFC. De nouvelles PSC sont en plus développées pour une utilisation spécifique en SFC. Face à l'introduction en continu de nouvelles PSC et de la complexité du mécanisme de reconnaissance chirale, de nombreuses équipes ont travaillé sur le développement d'un screening optimisé, basé sur des bibliothèques de racémiques, pour évaluer l'énantiosélectivité des PSC [91,92].

Bien que les auteurs se basent sur des sets de composés représentatifs du marché pharmaceutique actuel (majorité de composés basiques [93]), le jeu de PSC est très bibliothèque-dépendant. Par exemple, les PSC Chiralcel et Chiralpak de Daicel ont été comparées sur un set de 500 composés en SFC. Il en résulte un taux de succès de plus de 95% avec le classement suivant Chiralpak AD 60% > Chiralcel OD 31% > Chiralcel OJ 8% > Chiralpak AS 2% [94]. Ce n'est pas en accord avec un autre classement basé sur un autre jeu de composés AD > AS > OJ > OD [95].

De plus, de petites modifications structurales de l'analyte [89] et/ou le mode chromatographique peuvent avoir une influence significative sur les capacités énantiosélectives des PSC. Pour augmenter la probabilité de séparation énantiosélective, différents modes chromatographiques peuvent être testés. Wang *et al.* ont exploré la séparation du Nutlin-3 en SFC, en NPLC, RPLC et PO. La méthode développée sur Chiralcel OD en SFC a montré de meilleures performances en termes de sélectivité et d'efficacité [96].

La suite de la présentation portera sur la description des PSC les plus utilisées dans les développements de méthode chirale en SFC, à savoir les PSC de type Pirkle, Polysaccharide et macrocycles.

2.2. Les phases stationnaires chirales de type Pirkle

Introduites par Mikes en 1976 et développées par le groupe de Pirkle à l'Université d'Illinois, les phases de type Pirkle sont caractérisées par la fixation d'une petite molécule chirale sur un gel de silice. Elles sont qualifiées de PSC « indépendantes » puisque chaque entité agit de manière indépendante vis-à-vis des énantiomères. Il en résulte une compréhension simplifiée du mécanisme de reconnaissance chirale et un emploi raisonné de ces PSC. D'ailleurs, elles ont été étudiées par des méthodes de spectroscopie et de modélisation moléculaire.

Structurellement, ces PSC possèdent un noyau aromatique à caractère π -accepteur d'électron (dérivés benzoylés) et/ou π -donneur d'électron (dérivés naphtyles). Pirkle propose la formation de complexes diastéreoisomères labiles via la mise en jeu d'interactions π - π , de liaisons hydrogène, d'empilement de dipôles et d'interactions stériques. Ces interactions sont favorables dans des solvants apolaires, c'est pourquoi ces PSC sont largement employées en NPLC. De plus de nombreuses applications mentionnent leur utilisation dans des FS [97].

Différentes molécules chirales ont été fixées sur la silice et de nouvelles PSC ont été développées et commercialisées par différents fournisseurs. La phase Whelk-O1 (figure 1.16) reste l'exemple le plus connu. C'est une phase hybride avec des groupements accepteur et donneur d'électrons. Elle est comparable aux PSC de type polysaccharide, en termes de performances, avec une valeur ajoutée : durée de vie plus importante et compatibilité avec les éluants classiques tels que le dichlorométhane, l'isopropanol, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau. Plus récemment, la phase polyWhelk-O1, formée sur un squelette polyméthylhydrosiloxane, a été commercialisée. Elle permet d'améliorer les performances énantiosélectives des séparations (sélectivité et efficacité) par rapport à la Whelk-O1, et de diminuer la rétention des solutés.

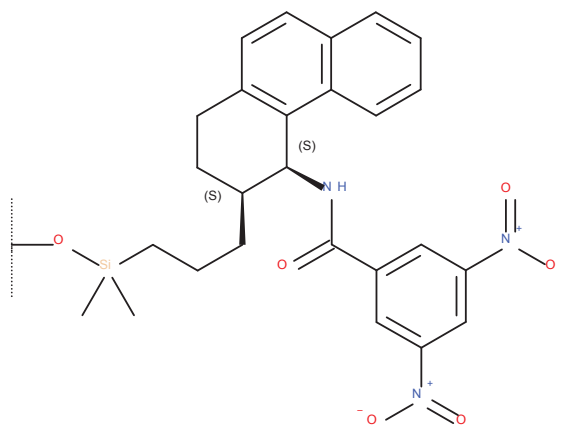


Figure 1.16 : Structure de la PSC (S,S)-WhelkO-1

Les phases de type Pirkle présentent trois avantages majeurs :

- (i) elles permettent le contrôle de l'ordre d'élution des énantiomères en modifiant la configuration du sélecteur chiral car les deux énantiomères sont disponibles. Dans le cadre de la mesure de pureté chirale (excès énantiomérique) ou chimique, une impureté peut être quantifiée avec précision lorsqu'elle est éluée de préférence en amont du pic majoritaire. A l'inverse, pour une purification, le produit désiré doit de préférence être élué le premier.
- (ii) ces phases sont toujours très employées dans les procédures de screening en raison de leur utilisation à l'échelle préparative
- (iii) elles offrent la possibilité d'utiliser des solvants forts puisque la phase est greffée.

2.3. Les phases stationnaires chirales de type polysaccharide

2.3.1. Contexte

La plupart des polymères naturels, incluant les polysaccharides, sont chiraux (cellulose, amylose, chitosane, xylane, curdlane, dextrane et inuline) et ont un potentiel d'applications chirales. La résolution d'acides aminés à l'aide de polysaccharide (cellulose) a

été reportée pour la première fois en 1951 par Kotake *et al.* [98]. Parmi les polymères naturels, la cellulose et l'amylose sont les plus abondants dans la nature (figure 1.17).

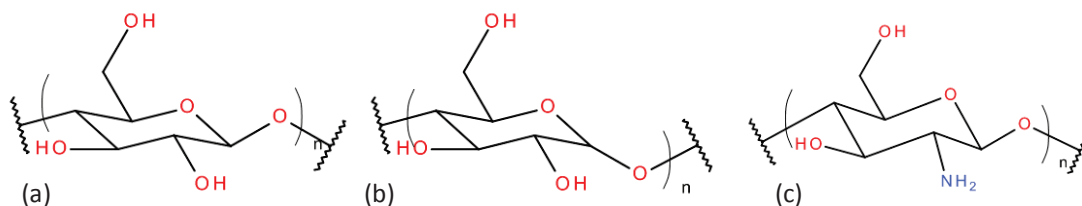


Figure 1.17 : Structure de (a) la cellulose native, de (b) l'amylose native et de (c) la chitosane native

L'efficacité des polymères natifs a été rapportée dans la littérature, *i.e.* *menthol*, *complexes métalliques chiraux*, *tryptophane*, *dérivés biphenyles* [99, 100]. D'un point de vue moléculaire, ils sont composés d'unités D-glucose reliés par des ponts glucosidiques (β -1,4 pour la cellulose et α -1,4 pour l'amylose). Des études spectroscopiques révèlent pour la cellulose, une structure en hélice gauche, enroulée autour de la liaison glycosidique. Les modèles de Liang et Marchessault (1959) et ceux de Blackwell (1977) soutiennent l'existence de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les monomères. Il en résulte une rigidité de la structure.

2.3.2. Cellulose triacétate

Bien que les polymères naturels soient capables de résoudre deux énantiomères, il a été montré que leur capacité de reconnaissance chirale pouvait être améliorée en optimisant les polysaccharides via leurs hydroxyles libres. En 1973, Hesse et Hagel identifient le potentiel de la cellulose triacétylée (CTA-I), obtenue par acétylation de la cellulose native microcristalline en phase hétérogène (figure 1.18). Cette dernière conserve la structure initiale de la cellulose, à savoir une association de chaînes de polymère en parallèle. Cependant, dans le cas où le triacétate de cellulose est solubilisé au cours de la réaction d'acétylation puis recristallisé (CTA-II), les propriétés de reconnaissance chirale sont affectées. Ceci est illustré par l'inversion d'ordre d'élution lors de l'analyse de la base de Tröger sur CTA-I et CTA-II [101].

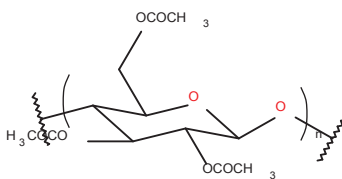


Figure 1.18 : Structure de la cellulose triacétate

Depuis, de nombreuses PSC polysaccharides ont été synthétisées. Alors que les dérivés tels que la cellulose carboxyméthylée et hydroxypropylée sont utilisés comme agents chiraux en électrophorèse capillaire, les dérivés phenylcarbamate et phenylester d'amylose et de cellulose sont principalement reconnus comme PSC en HPLC et en SFC. Les principaux travaux d'optimisation des polysaccharides ont été réalisés au Japon par l'équipe d'Okamoto à l'université d'Osaka et la compagnie Daicel. Une mise au point de Chankvetadze décrit les récents développements et applications de ces PSC [102].

2.3.3. Optimisation des polysaccharides : nature et morphologie du support

Les capacités énantiosélectives des PSC de type polysaccharide sont sensiblement affectées par **la nature et la morphologie du support**, affectant la cinétique et la dynamique du processus de séparation [102]. Le procédé d'adsorption a été décrit par Okamoto en 1984. Il consiste en la réaction du polymère natif avec un dérivé phenylisocyanate. Le polymère dérivé est ensuite solubilisé puis généralement adsorbé sur des particules de silice greffée aminopropyle. Ce type de support a un double intérêt : (i) diminuer les interactions non-spécifiques en masquant les silanols résiduels et (ii) stabiliser le dépôt via la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements aminopropyles et le carbamate. Les travaux de Grieb reportent la possible utilisation de silice inactivée [103]. En raison de son caractère polaire, l'adsorption d'un polymère dérivé est favorisée. Cependant, la quantité de polymère adsorbée est relativement faible par rapport à la quantité adsorbée sur le support greffé aminopropyle, ce qui réduit le nombre de sites d'interactions et donc les performances de la PSC.

En 2003, le dépôt du sélecteur *tris*-(3,5-diméthylphenylcarbamate) de cellulose sur une silice monolithique a été pour la première fois rapporté. Ce procédé combine les performances élevées du sélecteur chiral et les propriétés dynamiques des supports monolithiques [16, 104].

Dans le même contexte, le dépôt du polysaccharide *tris*-(4-chloro-3-méthylphenylcarbamate) de cellulose sur des particules de silice à porosité superficielle (noyau non poreux) a également été décrit [105]. Les particules à noyau solide sont connues pour améliorer les performances cinétiques [106]. Si de récentes études présentent leur intérêt pour la séparation d'énantiomères [105, 107], certaines laissent penser qu'elles offrent une nouvelle direction pour le développement de PSC [108].

2.3.4. Optimisation des polysaccharides : procédé du dépôt

Les **procédés de dépôt** affectent la morphologie (structure supramoléculaire) de la PSC. Une telle corrélation entre le mécanisme de reconnaissance chiral et la structure supramoléculaire avait déjà été mis en évidence avec les celluloses triacétate CTA-I et CTA-II. L'approche par évaporation du solvant sous pression réduite conduit à une structure compacte et ordonnée alors que la précipitation du polymère par ajout contrôlé d'anti-solvant conduit à une structure partiellement ordonnée et moins compacte. Francotte et Zhang étudient l'influence des deux procédés sur les performances de la phase méta-méthylbenzoyl cellulose. La précipitation du polymère à l'aide de chlorure de méthylène confère de meilleurs résultats par rapport au procédé d'évaporation. Une structure ordonnée et compacte semble être défavorable à l'insertion du soluté dans les cavités chirales et donc empêche les interactions soluté/PSC. Le choix du solvant de dépôt joue également un rôle prépondérant sur le procédé d'adsorption, comme l'ont postulé Shibata [109] pour les dérivés phénylester en 1987 et Yashima pour les dérivés phenylcarbamate en 1996 [110]. Le solvant de dépôt gouverne l'arrangement tridimensionnel et l'orientation du polymère.

2.3.5. Optimisation des polysaccharides : nature du ligand

Les capacités énantiosélectives des PSC de type polysaccharide sont aussi sensiblement affectées par la **nature de substituants sur le cycle aromatique**. Les dérivés phenylcarbamate et phénylester de cellulose et d'amylose sont les plus largement employés en

raison de leur grande stabilité et présentent un grand nombre d'applications. L'équipe d'Okamoto a tenté d'introduire simultanément des fonctions carbamate et benzoate sur les positions 2, 3 et 6 des unités glucose. Ils présentent des performances élevées [111] mais n'ont pas été commercialisés. Les propriétés énantiosélectives des dérivés aromatiques carbamate et ester sont améliorées lors de l'addition de substituants donneur ou accepteur d'électrons sur le phényle tels des groupes méthyles ou halogènes [112, 113].

Les **dérivés benzoates** substitués avec un alkyl (Figure 1.19), donneur d'électron, voient la densité électronique du groupement carbonyle augmenter. Il en résulte une réelle amélioration de la capacité énantiosélective de la PSC comparativement aux dérivés à caractère accepteur d'électron. La phase 4-méthylbenzoate présente des performances élevées vis-à-vis d'un large panel de molécules chirales et est commercialisée sous le nom de Chiralcel OJ (Daicel), Lux Cellulose-3 (Phenomenex) ou Reprosil Chiral-JM (Dr Maisch) pour en citer quelques-unes. Cependant, l'introduction du groupement donneur méthoxy -CH₃O (figure 1.19) induit des performances relativement faibles, notamment à cause de sa forte polarité. La nature du polymère impacte également les capacités énantiosélectives des dérivés esters. Les celluloses triacétate, tribenzoate, tricinnamate et *tris*-(4-méthylbenzoate) sont des PSC polyvalentes et sont privilégiées au dépend de leurs homologues amyloses.

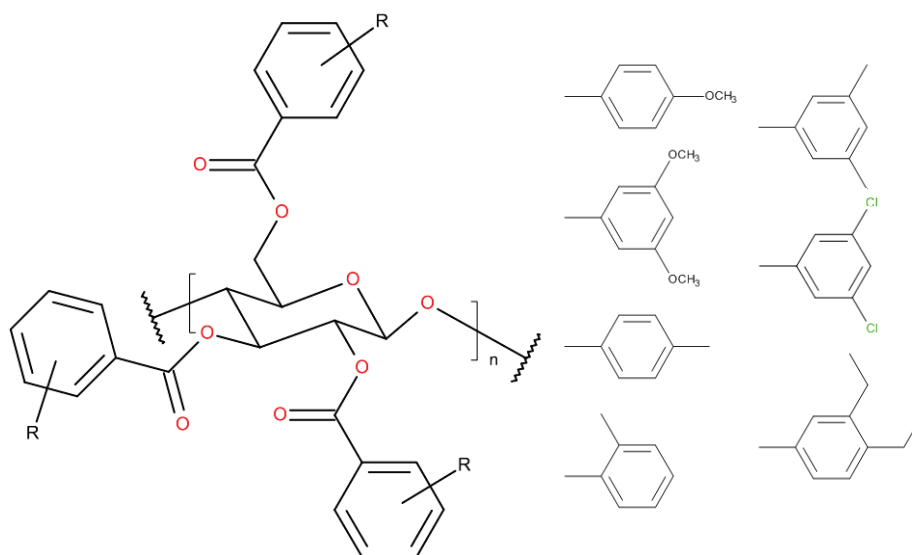


Figure 1.19 : Structure des dérivés cellulose tribenzoates

La nature des substituants sur le cycle aromatique affecte également les **dérivés phenylcarbamates**, en modifiant la densité électronique du carbamate et donc les interactions soluté/sélecteur chiral. La présence d'un substituant électro-accepteur sur le cycle aromatique augmente l'acidité du -NH du carbamate et favorise les liaisons hydrogène avec les composés basiques. A l'inverse, la présence d'un substituant électro-donneur sur le cycle aromatique augmente l'acidité du C=O du carbamate et favorise les liaisons hydrogène avec les composés acides. Initialement développés par Okamoto, les PSC *tris*-(3,5-diméthylphenylcarbamate) de cellulose (Chiralcel OD) et d'amylose (Chiralpak AD) sont des PSC polyvalentes et permettent de résoudre plus de 90% des racémiques pharmaceutiques. Cependant, l'introduction de certains substituants (NO₂ ou CH₃O) sur le phényle ne favorise pas de hautes performances pour les dérivés phenylcarbamate (figure 1.20).

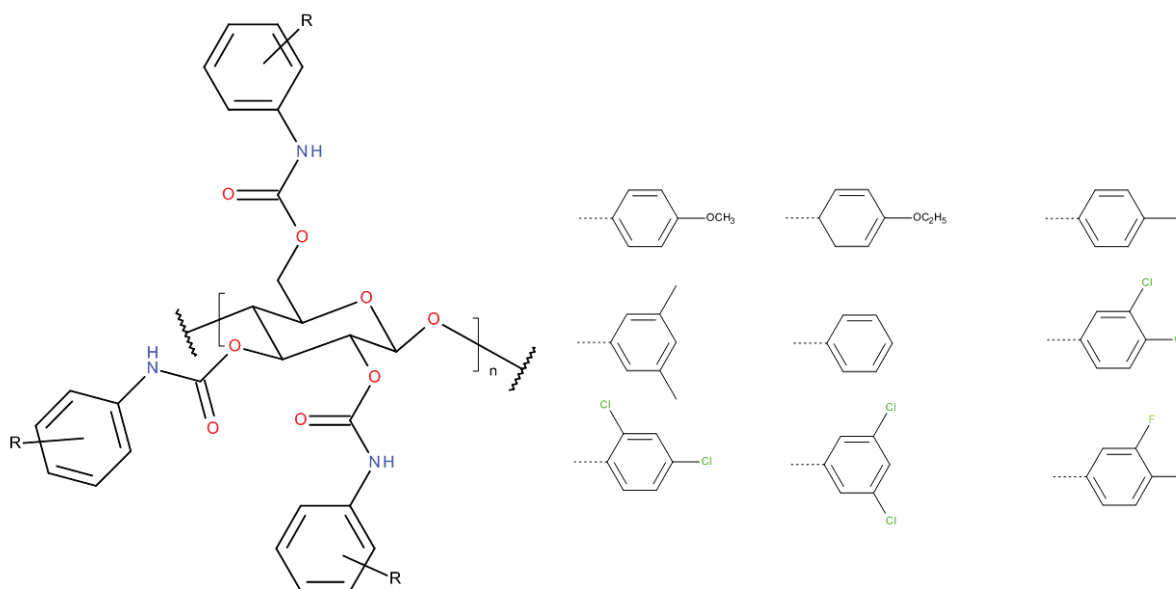


Figure 1.20 : Structure des dérivés cellulose trisphenylcarbamate

L'introduction simultanée de substituants accepteur (chlore) et donneur (méthyle) d'électron modifie les propriétés électroniques et structurales de la phase stationnaire. Les dérivés « halométhylphenylcarbamate » de cellulose et d'amylose ont été introduits par Chankvetadze *et al.*, il y a une vingtaine d'années [114]. Les substituants interviennent de manière indirecte sur la structure secondaire du polysaccharide via les propriétés électroniques du carbamate. D'une part, la présence d'un halogène favorise l'existence de –

NH libre, conduisant à augmenter le nombre de sites d'adsorption. D'autre part, l'introduction d'un groupement alkyl favorise l'existence de liaisons hydrogène intramoléculaires via les –NH du carbamate, privilégiant une structure secondaire ordonnée. La phase *tris*-(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) de cellulose illustre l'équilibre du ratio –NH_{libre} versus –NH_{intramoléculaire}. Une étude par ECD (dichroïsme circulaire électronique) met en évidence une structure secondaire ordonnée avec des sites d'interactions uniformes [115]. Une étude a également démontré que les phases halogénées présentent des capacités énantiosélectives complémentaires par rapport aux PSC non halogénées [115]. Les placer en première intention dans un screening ne semble donc pas aberrant [116].

2.3.6. Optimisation des polysaccharides : technique d'immobilisation

Les PSC adsorbées sont soumises à une restriction majeure concernant la non-compatibilité avec certains solvants organiques : le *diméthylsulfoxyde* (DMSO), le *dichlorométhane* et le *chloroforme* sont souvent utilisés par les chimistes pour solubiliser les échantillons peu solubles dans les solvants traditionnels ; l'*acétate d'éthyle*, le *toluène*, le *N,N*-diméthylformamide (DMF), le tétrahydrofurane (THF) et le *méthyl-t-butyl-ether* (MtBE) correspondent aux solvants les plus communément rencontrés lors des synthèses dans l'industrie pharmaceutique ; le *cyclopentyl-méthyl-ether* (CPME) et le *2-méthyl-tétrahydrofurane* sont des solvants verts, alternatifs à l'utilisation de THF et MtBE. Il est également intéressant de remarquer que ces solvants sont nécessaires à la détermination du mécanisme de reconnaissance chirale en RMN et avec d'autres techniques spectroscopiques.

Un grand nombre de travaux ont permis l'introduction des PSC immobilisées sur le marché en 2004. Elles sont une réelle innovation car elles permettent de favoriser la transposition à l'échelle préparative et d'améliorer le temps de vie des PSC. Les colonnes Chiralpak IA, IB, IC, ID, IE et IF ont permis de développer et diversifier le domaine des séparations chirales en HPLC et SFC. Le contrôle de la cristallinité des phases immobilisées de Daicel affecte surtout l'efficacité et l'asymétrie, mais peu l'énantiosélectivité. Les solvants non traditionnels peuvent être employés pour améliorer la solubilité des composés et apporter

de nouvelles sélectivités [117]. Dans l'industrie, ces phases sont un outil de routine en libre accès pour le contrôle des réactions stéréospécifiques des chimistes [118].

Les différentes procédures d'immobilisation des polysaccharides sont nombreuses et sont rapportées dans la littérature [119, 120]. En 1987, l'équipe d'Okamoto rapporte pour la première fois l'immobilisation de la cellulose *tris*-(3,5-diméthylphenylcarbamate) sur une silice greffée 3-aminopropyle à l'aide d'un agent bifonctionnel [119, 121]. Le procédé est décrit figure 1.21. La cellulose native est dérivée en cellulose tritylée puis solubilisée dans du chloroforme afin de réaliser son dépôt à la surface de la silice γ -aminopropyle. Un traitement acide est ensuite appliqué pour régénérer la cellulose avec des hydroxyles libres. Enfin, l'introduction de diisocyanate et 3,5-diméthyl isocyanate constitue un agent réticulant (« cross-linker ») covalent entre les groupements amines de la silice modifiée et les groupements hydroxyles en position 2, 3 et 6 du polysaccharide. On suppose également la possible formation d'un réseau en raison de l'interaction entre l'agent réticulant et les hydroxyles du polymère. En 1994, une procédure régiosélective a été développée, à l'aide d'un agent réticulant 4,4'-diphénylméthane pour immobiliser les polysaccharides via ses groupements hydroxyles [122]. Cependant, ces PSC montrent des capacités de reconnaissance chirale faibles par rapport à leurs homologues adsorbés.

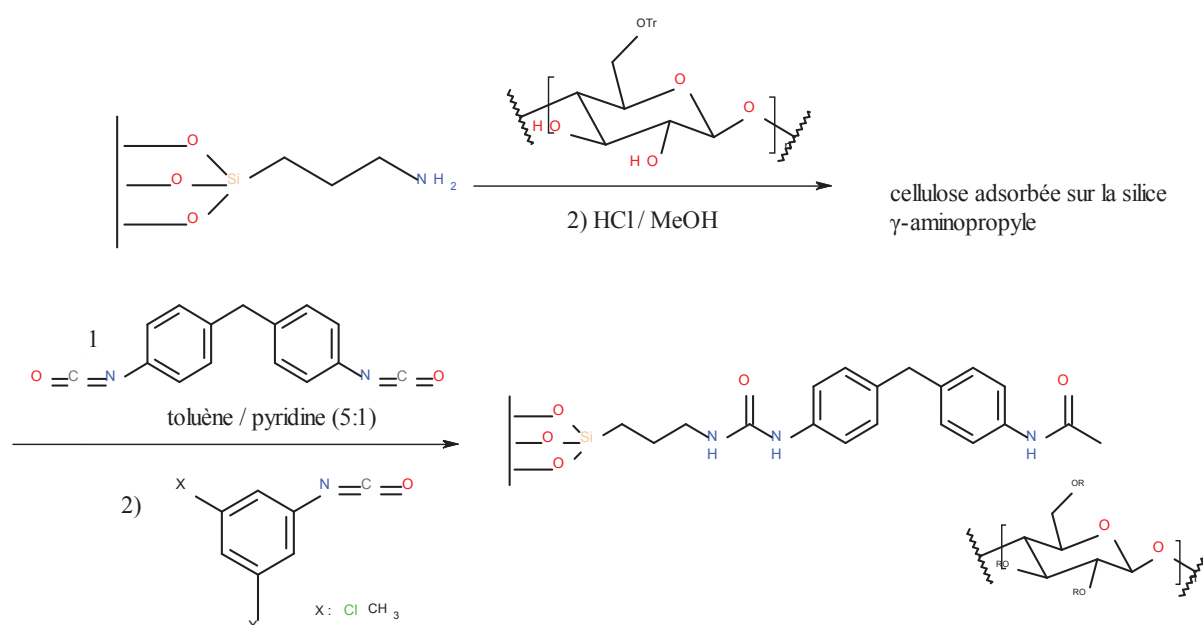


Figure 1.21 : Procédé d'immobilisation de la cellulose *tris*-(3,5-diméthylphenylcarbamate) développé par Okamoto en 1987 [119]

En 1996, Enomoto décrit l'immobilisation de l'amylose par réduction du résidu terminal du polymère par polymérisation enzymatique d'unité α -D-glucose-1-phosphate. Deux méthodes sont décrites dans la littérature [123]. La préparation de la PSC immobilisée amylose *tris*-(3,5-diméthylphenylcarbamate) conduit à des performances équivalentes par rapport à la PSC adsorbée et son utilisation dans les solvants non conventionnels a été démontrée. Le principal avantage de cette procédure est de conserver la structure secondaire de l'amylose lors de l'immobilisation. Cependant, elle n'est pas transposable aux dérivés de la cellulose [124].

En 2001, le procédé d'immobilisation de polysaccharide par réaction avec une fonction allylique a été introduit par Oliveros et Minguillon [125]. Le procédé est décrit figure 1.22. Il met en jeu des polysaccharides mixtes (amylose, cellulose, chitosan) porteurs de groupements 10-undecenoate (en position 6, il induit la fixation) et 3,5-diméthylphenylcarbamate (permet la discrimination chirale). Le polysaccharide porteur de groupements allyliques est adsorbé à la surface de la silice, puis immobilisé par voie radicalaire thermique en présence d'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN). Les auteurs observent un degré d'immobilisation non optimum probablement dû à la faible réactivité des groupements 10-undecenoate.

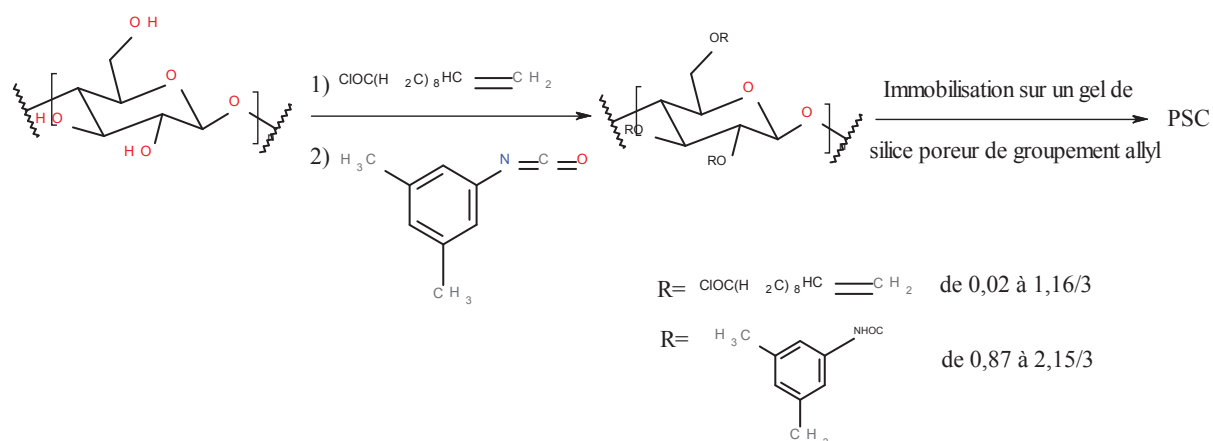


Figure 1.22 : Procédé de fixation par réaction du polysaccharide « mixte » avec un gel de silice allyle

Kubota et ses collaborateurs proposent l'immobilisation de la cellulose 4-vinylbenzoate sur une silice modifiée par polymérisation radicalaire [124]. Le procédé est

décrit figure 1.23. Il implique la présence de double-liaison dans la structure de la matrice et du polysaccharide. La cellulose dérivée, à l'aide de chlorure de 4-vinylbenzoate, est immobilisée sur une matrice de silice traitée avec du chlorure d'acrylate. Il en résulte des capacités de reconnaissance chirale légèrement plus faibles que son homologue adsorbé, probablement en raison d'une altération de la structure secondaire du polymère.

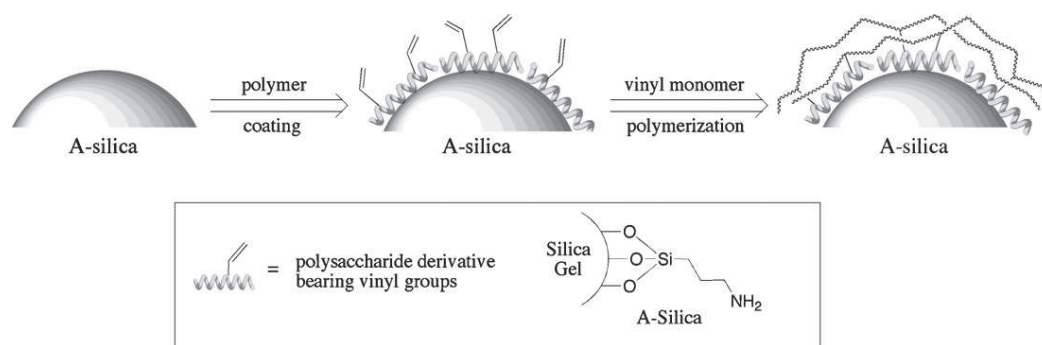


Figure 1.23 : immobilisation par copolymérisation radicalaire [126]

En 1996, Francotte *et al.* décrivent différents procédés d'immobilisation :

- (i) par réticulation des chaînes de polysaccharide porteur de groupements photopolymérisables, sous l'action d'une lampe à vapeur de mercure. Francotte et Huynh évaluent les performances de trois phases halogénées phenylcarbamate alors que celles-ci sous issues d'une immobilisation photochimique. Les auteurs démontrent l'efficacité de la technique d'immobilisation [127].
- (ii) Par réticulation des chaînes de polysaccharide, en absence de groupements photopolymérisables, sous l'effet d'un rayonnement UV.
- (iii) Par un procédé thermique qui implique la présence du polysaccharide et d'une quantité importante d'azo-bis-isobutyronitrile.

De manière générale, il a été observé que les capacités énantiosélectives des PSC immobilisées sont plus faibles que les PSC déposées, dans des conditions opératoires comparables. Ceci s'explique par le changement de la configuration de la structure secondaire lors du processus d'immobilisation. Dans le cas du greffage covalent, proposé par Okamoto, le changement de configuration peut s'expliquer par le fait qu'il y ait moins de trois ligands

par unité glycosidique. Cependant, la diversité des conditions opératoires applicables permet à ces phases d'offrir des performances importantes. Certains auteurs rapportent la complémentarité des phases immobilisées et déposées. Zhang *et al.* comparent la séparation de la bupivacaine sur Chiralpak AD et IA avec une phase mobile acétonitrile-diéthylamine (100:0,1, v/v) et rapportent de meilleurs résultats sur cette dernière [128, 129].

En parallèle du développement de nouvelles PSC polysaccharides, un marché concurrentiel s'est développé avec l'apparition de phases « génériques », qui résultent de l'expiration des brevets relatifs aux colonnes chirales déposées de Chiral Technologies, dont les plus connues sont appelées les « golden 4 » (Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralcel OJ et Chiralpak AS). Par exemple, Phenomenex introduit Lux Cellulose-1 et Lux Cellulose-3, copies respectives de Chiralcel OD et Chiralcel OJ. ES Industries développe les phases génériques halogénées Epitomize 1K, 1Z. Dr Maisch produit une ligne de colonnes chirales copies des « Golden 4 ». De Klerck *et al.* ont comparé les capacités énantiosélectives de 12 PSC polysaccharides de différents fabricants en SFC. Les auteurs confirment que les PSC ayant le même SC ne présentent pas les mêmes capacités énantiosélectives et ne sont donc pas directement interchangeables [130].

2.4. Les phases macrocycliques

Les quatre principaux types de phases macrocycliques sont les cyclodextrines (CDs), les cyclofructanes, les éthers-couronnes et les glycopeptides. Les cyclodextrines et les glycopeptides sont très utilisées en électrophorèse capillaire, les CDs dominent la chromatographie en phase gazeuse chirale alors que les glycopeptides continuent de s'implanter comme des sélecteurs chiraux efficaces en chromatographie en phase liquide.

2.4.1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont obtenues après dégradation de l'amidon, suivie d'un couplage enzymatique d'unités de glucose. Il en résulte une structure toroïdale homogène de diverses tailles (figure 1.24). Les macrocycles contenant 6 (α -CD), 7 (β -CD) ou 8 (γ -CD) unités de glucose adoptent une forme en abat-jour, caractérisée par une cavité interne hydrophobe, liée au squelette carboné des sucres, et une surface extérieure hydrophile, liée à la présence de

groupements hydroxyles. Ce sont des entités plus ou moins hydrosolubles capables de piéger des espèces lipophiles au sein de leurs cavités.

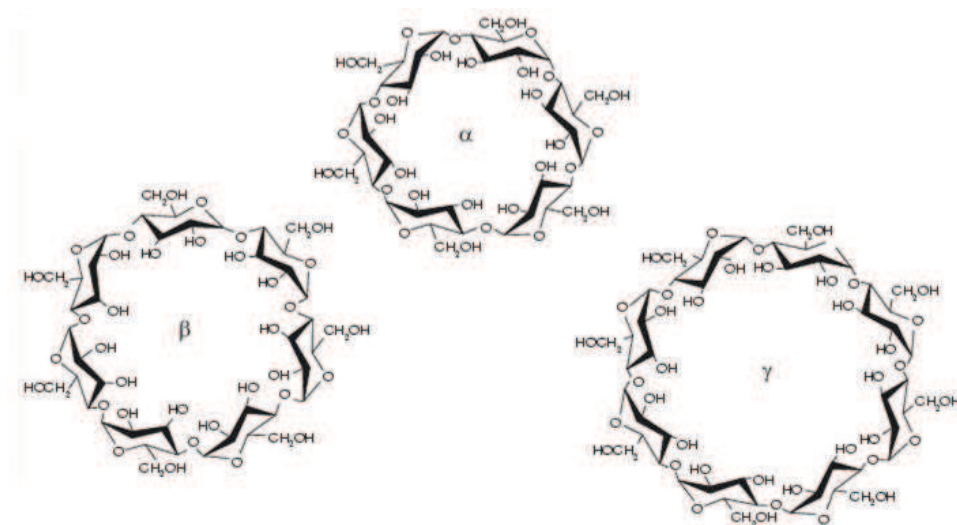


Figure 1.24 : Structure de α -CD, β -CD et γ -CD.

C'est en 1982 qu'Armstrong confirme les hypothèses de Cramer quant à l'utilité des cyclodextrines dans le domaine des sciences séparatives. Le mécanisme de discrimination repose sur le concept « host-guest chemistry ». Il définit la formation d'un complexe réversible d'inclusion entre l'entité hôte et une molécule spécifique. En effet, un segment hydrophobe de la molécule pénètre dans la cavité de la CD, déplaçant ainsi les molécules de l'éluant (figure 1.25a). Leur emploi en SFC a montré des performances élevées, en raison de la faible taille des molécules de CO₂ qui peuvent être plus facilement déplacées que celles des solvants organiques utilisés en RPLC [131]. Utilisées en mode polaire organique (POSC) et phase normale (NPLC), le mécanisme repose essentiellement sur la stabilisation du complexe transitoire via les groupements hydroxyles (interactions de surface) (figure 1.25b).

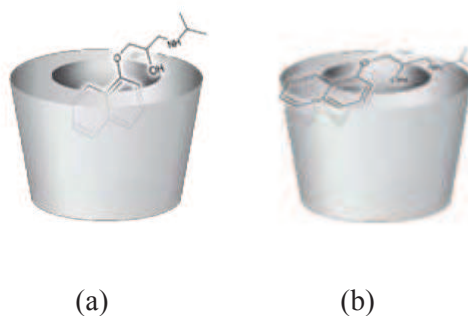


Figure 1.25 : mécanisme (a) d'inclusion et (b) interactions de surfaces

Les CDs sont greffées à la surface de la silice soit via des liaisons éthers (Cyclobond d'Astec), soit via des liaisons carbamates (ChiraDex ou ChiraDex gamma de Merck, Ultron ES-CD de Shinwa). La taille et l'accès des cavités, la fonctionnalisation des CDs et la nature du greffage, permettent de moduler les capacités de reconnaissance chirale.

2.4.2. Les cyclofructanes

Les cyclofructanes (CFs) ont été introduits en 2009 par Armstrong et constituent une nouvelle classe de sélecteurs chiraux [132]. Ils sont obtenus par fermentation enzymatique de l'inuline, polysaccharide de fructose. Il en résulte des oligosaccharides cycliques constitués d'unités de D-fructofuranose reliées par des liaisons β -2,1-glycosidiques: 6 unités CF6, 7 unités CF7 ou 8 unités CF8 (figure 1.26).

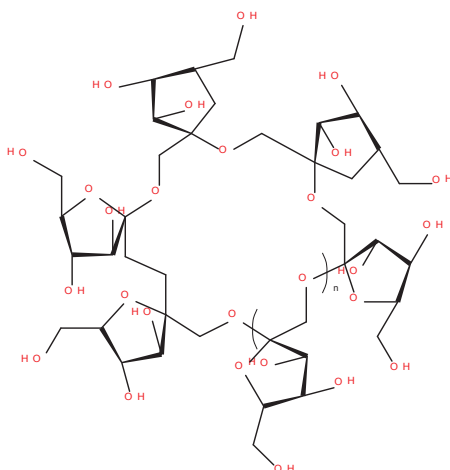


Figure 1.26 : Structure des cyclofructanes n=1, CF6 ; n=2 CF7 ; n=3, CF8

Leur mécanisme de reconnaissance chirale est différent de celui des CDs puisque le cœur de la structure des CFs est hydrophile. Il repose sur la contribution majoritaire de liaisons hydrogène, ainsi que des interactions stériques. Alors que les capacités énantiosélectives des CFs natifs sont limitées, leurs dérivés (aliphatiques ou aromatiques) les rendent polyvalents [133].

2.4.3. Les Glycopeptidiques Macrocycliques

Les Antibiotiques ou Glycopeptides Macrocycliques (MGA) ont été introduites par Amstrong en 1994 en observant l'inhibition de la prolifération des bactéries en fixant le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala de la paroi des bactéries Gram +. En fixant ces molécules multi-fonctionnelles à un support de silice, elles permettent la séparation d'un large panel de racémiques, notamment les acides aminés et les peptides [134]. Aujourd'hui, elles sont commercialisées par Astec et Supelco sous le nom de Chirobiotic : Ristocetin, Vancomycin, Teicoplanin et sa forme aglycone. D'autres PSC Glycopeptides Macrocycliques ont fait l'objet d'études mais n'ont pas été commercialisées, comme par exemple l'Avoparcin, l'Eremomycin, la Glycopeptide A-40, 926 et Hepta-Tyr.

Ce sont des PSC multimodales. Leur succès est reconnu pour un grand nombre d'applications en NPLC, RPLC, POSC et SFC. Liu et ses collaborateurs ont évalué et comparent les capacités énantiosélectives de 3 glycopeptides macrocycliques en SFC pour la séparation d'un jeu de composés divers (hétérocycles, sulfoxydes, analgésiques, β -bloquants) [135]. La complémentarité de ces PSC réside dans la diversité des structures moléculaires et des sites de liaisons, ainsi que des motifs de glycosylation. Les macrocycles glycopeptides partagent un cœur aglycone formé par des cycles aromatiques liés les uns aux autres par des liaisons éther et des groupements amide. La structure de la Teicoplanin aglycone en est la plus simple. En revanche, elles se distinguent par le nombre d'unités glucopyranoses (Ristocetin : 6 ; Teicoplanin : 3 ; Vancomycin : 2), ainsi que l'orientation et la nature des résidus fixés au cœur aglycone (figure 27).

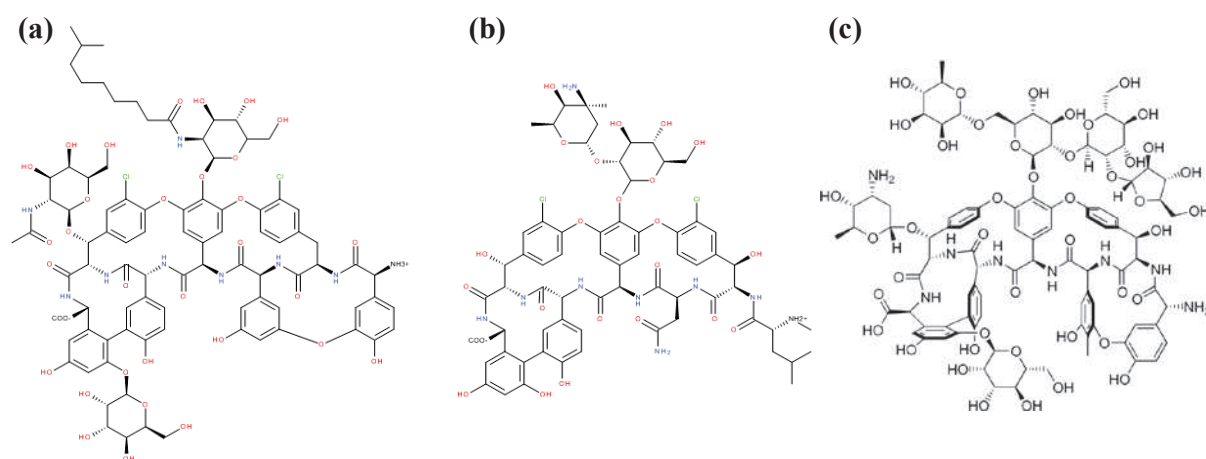


Figure 1.27 : Structures de macrocycles glycopeptides (a) Teicoplanin, (b) Vancomycin et (c) Ristocetin

Ces PSC possèdent une ou plusieurs unités carbohydrates à la surface du macrocycle. Si elles permettent d'améliorer la solubilité du cœur aglycone dans certains cas, la comparaison de la Teicoplanin T et TAG (aglycone) met en évidence un taux de succès plus élevé pour la séparation d'acides aminés sur cette dernière. En effet, la présence de l'unité carbohydrate semble imposer une gêne stérique et empêche l'insertion la reconnaissance chirale de certains acide aminés. [136].

IV. Conclusion et introduction des travaux de recherche

Même si en 2001, le journal Libération résume la chiralité à « *Il fallait donc savoir distinguer la gauche de la droite pour recevoir le Nobel de chimie.* », le domaine de la chiralité anime toujours un grand nombre de scientifiques, un siècle et demi après la découverte de Pasteur. L'énantiomérisme, phénomène omniprésent dans la nature, est devenu un enjeu majeur dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, environnemental et agroalimentaire.

Des méthodes séparatives à l'aide de phases stationnaires énantiosélectives de structures variées sont mises en œuvre. Parmi ces outils, ce n'est pas étonnant de voir que la chromatographie en phase supercritique se positionne comme une méthode de choix pour la résolution rapide, efficace et directe de stéréoisomères. La littérature recense un grand nombre d'exemples de la SFC chirale comme solution alternative à l'HPLC [137-139]. Le monde industriel y a trouvé son intérêt à travers une instrumentation robuste, l'automatisation, le développement de méthode rapide et le couplage à la masse [140,141], l'aspect économique (disponibilité et le coût des solvants) et écologique pour les applications préparatives [142], ainsi qu'une éventuelle future mise en œuvre du système SMB avec fluide supercritique (SF-SMB) pour les séparations chirales à grande échelle [143].

Cependant, la faible compréhension des mécanismes intervenant dans la reconnaissance chirale limite un choix rationnel reposant sur la structure des composés chiraux, conduisant à une procédure de développement de méthode de séparation chirale systématique, fastidieuse et coûteuse d'essais et erreurs [16]. Par conséquent, la recherche fondamentale est une plateforme pour rationaliser les procédés de séparation chirale [31].

Au sein de notre équipe, des travaux ont été entrepris pour améliorer la compréhension des phénomènes afin de simplifier les procédures expérimentales. Une exploration fine de l'effet des paramètres opératoires en SFC a été réalisée, à l'aide d'outils de modélisation moléculaire appropriés à la reconnaissance énantiosélective.

Le mécanisme de reconnaissance chirale est fortement impacté par la nature de la phase stationnaire. Le **chapitre II** présente l'étude et la caractérisation de phases stationnaires chirales de type polysaccharides en chromatographie en phase supercritique. Des relations quantitatives structure-rétention sont utilisées afin de mieux comprendre les interactions non-spécifiques et énantiosélectives responsables du mécanisme de reconnaissance chirale. Diverses techniques d'analyse de données multivariées sont mises en œuvre (régression linéaire multiple, analyse en composante principale, classification ascendante hiérarchique, analyse factorielle discriminante) afin de structurer l'ensemble des données et d'identifier les informations pertinentes.

Le **chapitre III** correspond à l'étude de l'influence de la nature et la composition de l'éluant supercritique. En effet, la composition de la phase mobile doit également être considérée comme un paramètre clé. Le CO₂, les modificateurs ou les additifs affectent la qualité de la séparation à travers (i) des changements de propriétés physico-chimiques de la phase mobile, (ii) l'altération de l'environnement des cavités chirales de la phase stationnaire et/ou (iii) la modification de la structure de l'isomère analysé.

Dans la même dynamique, le comportement de rétention dans des phases mobiles supercritiques (CO₂/alcool) et liquide (heptane/alcool) est étudié afin de déterminer dans quelle mesure le transfert de HPLC à SFC est possible.

Les **chapitres IV et V** constitue le point ultime du manuscrit. Dans une première partie, des cartographies rétentives et énantiosélectives des PSC en SFC sont proposées et reposent sur l'ensemble des données descriptives développées dans le chapitre II. Puis, à l'aide d'outils chimiométriques, les modèles établis sont évalués en fonction de leur capacité à prédire la possibilité ou non de réaliser une séparation chirale sur un couple d'énantiomères donné dans un système séparatif donné.

Références du chapitre I

- [1] S. Sarrade, Quelles sont les ressources de la chimie verte?, EDP Sciences, Septembre 2008.
- [2] Y.K. Tovbin, Russian journal of physical chemistry A, 83 (2009) 1643.
- [3] D.F. Williams, Chem. Eng. Sci., 36 (1981) 1769.
- [4] C. Jousset-Dubien, in, Université de Bordeaux I, 1996.
- [5] The Journal of Organic Chemistry, 27 (1962) 700.
- [6] M. Saito, J. Biosci. Bioeng., 115 (2013) 590.
- [7] G. Guiochon, A. Tarafder, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 1037.
- [8] L.J. Lamm, Y. Yang, Anal. Chem., 75 (2003) 2237.
- [9] T.S. Reighard, S.V. Olesik, Crit. Rev. Anal. Chem., 26 (1996) 61.
- [10] M. Perrut, The Journal of Supercritical Fluids, 66 (2012) 359.
- [11] W.-J. Kim, J.-D. Kim, J. Kim, S.-G. Oh, Y.-W. Lee, J. Food Eng., 89 (2008) 303.
- [12] T.A. Berger, J. Chromatogr. A, 785 (1997) 3.
- [13] J. Zheng, T. Glass, L.T. Taylor, J.D. Pinkston, J. Chromatogr. A, 1090 (2005) 155.
- [14] T. Didier, Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives, base documentaire : TIB385DUO.
- [15] P.R. Sassiat, P. Mourier, M.H. Caude, R.H. Rosset, Anal. Chem., 59 (1987) 1164.
- [16] C.F. Poole, J. Chromatogr. A, 1250 (2012) 157.
- [17] T.A. Berger, W.H. Wilson, Anal. Chem., 65 (1993) 1451.
- [18] S. Khater, C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A, 1319 (2013) 148.
- [19] C. Hamman, M. Wong, M. Hayes, P. Gibbons, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 3529.
- [20] E. Lesellier, A. Latos, A.L. de Oliveira, J. Chromatogr. A, 1327 (2014) 141.
- [21] E. Lesellier, C. West, A. Tchaplal, J. Chromatogr. A, 1018 (2003) 225.
- [22] B. Su, Z. Bao, H. Xing, Y. Yang, Q. Ren, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 5140.
- [23] M. Sauceau, J.J. Letourneau, D. Richon, J. Fages, Fluid Phase Equilib., 208 (2003) 99.
- [24] M. Sauceau, J. Fages, J.J. Letourneau, D. Richon, Ind. Eng. Chem. Res., 39 (2000) 4609.
- [25] T. Clifford, in, Oxford University Press, New York :, 1999.
- [26] J.G.M. Janssen, P.J. Schoenmakers, C.A. Cramers, J. High. Resolut. Chromatogr., 12 (1989) 645.
- [27] T. Wang, R.M. Wenslow Jr, J. Chromatogr. A, 1015 (2003) 99.
- [28] T.A. Berger, L.M. Blumberg, Chromatographia, 38 (1994) 5.

-
- [29] X. Lou, H.-G. Janssen, H. Snijders, C.A. Cramers, J. High. Resolut. Chromatogr., 19 (1996) 449.
- [30] A. Tarafder, K. Kaczmarek, M. Ranger, D.P. Poe, G. Guiochon, J. Chromatogr. A, 1238 (2012) 132.
- [31] T.L. Chester, J.D. Pinkston, Anal. Chem., 76 (2004) 4606.
- [32] M.C. Herrera, R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta, 463 (2002) 189.
- [33] Q. Sun, S.V. Olesik, Anal. Chem., 71 (1999) 2139.
- [34] M. Zougagh, A. Ríos, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 524 (2004) 279.
- [35] G. Anitescu, L.L. Tavlarides, The J. Sup. Fluids, 38 (2006) 167.
- [36] J.-M. Aracil, Revue française d'oenologie, (mai/juin 2002) 34.
- [37] M. Türk, The J. Sup. Fluids, 47 (2009) 537.
- [38] J. Fages, H. Lochard, E. Rodier, J.-J. Letourneau, M. Sauceau, The Canadian Journal of Chemical Engineering, 81 (2003) 161.
- [39] K. Erdogan, F.B. Joan, Sup. Fluid Eng. Sci., American Chemical Society, 1992.
- [40] L.T. Taylor, The J. Sup. Fluids, 47 (2009) 566.
- [41] C.M. Harris, Anal. Chem., 74 (2002) 87 A-91 A.
- [42] C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A, 1115 (2006) 233.
- [43] C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A, 1169 (2007) 205.
- [44] C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A, 1110 (2006) 200.
- [45] C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A, 1191 (2008) 21.
- [46] C. West, E. Lesellier, J. Chemom., 26 (2012) 52.
- [47] D. Okamoto, Y. Hirata, Anal. Sci., 22 (2006) 1437.
- [48] L.R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr, J. Chromatogr. A, 1060 (2004) 77.
- [49] D.H. Marchand, L.R. Snyder, J.W. Dolan, J. Chromatogr. A, 1191 (2008) 2.
- [50] E. Lesellier, C. West, A. Tchaplal, J. Chromatogr. A, 1111 (2006) 62.
- [51] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, J. Chromatogr. A, 1189 (2008) 109.
- [52] I. François, P. Sandra, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 4005.
- [53] D.V. McCalley, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 858.
- [54] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J. Boccard, J.-L. Veuthey, D. Guilleme, J. Chromatogr. A, 1262 (2012) 205.

- [55] Christopher J. Welch, William R. Leonard Jr., Jimmy O. DaSilva, Mirlinda Biba, Jennifer Albaneze-Walker, Derek W. Henderson, Brian Laing, D.J. Mathre, LC GC Europe, 18 (2005) 264.
- [56] K.M. Belyk, B. Xiang, P.G. Bulger, W.R. Leonard, J. Balsells, J. Yin, C.-y. Chen, Organic Process Research & Development, 14 (2010) 692.
- [57] C. White, J. Chromatogr. A, 1074 (2005) 163.
- [58] C.M. Kraml, D. Zhou, N. Byrne, O. McConnell, J. Chromatogr. A, 1100 (2005) 108-115.
- [59] G.B. Cox, Chromatography Today, (2009) 4.
- [60] R. Mukhopadhyay, Anal. Chem., 80 (2008) 3091-3094.
- [61] K. Anton, C. Berger, Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns: Techniques and Applications, Taylor & Francis, 1997.
- [62] B.L. Ligon, Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 13 (2002) 134.
- [63] W.T.B. Kelvin, Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light, C.J. Clay and Sons, 1904.
- [64] F.A. Carey, R.J. Sundberg, Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms, Kluwer Academic/Plenum Pub., 2000.
- [65] A. Collet, J. Crassous, J.P. Dutasta, L. Guy, Molécules chirales: stéréochimie et propriétés, EDP Sciences, 2006.
- [66] R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, Angewandte Chemie International Edition in English, 5 (1966) 385.
- [67] J. Gal, Chirality, 24 (2012) 959.
- [68] G.P. Blanch, M.a.d.M. Caja, M.a.L. Ruiz del Castillo, M. Herraiz, J. Agric. Food. Chem., 46 (1998) 3153.
- [69] R. Zawirska-Wojtasiak, Acta Sci.Pol, 1 (2006) 21.
- [70] B. Saint-Martin, A. El Fouikar, M. El Mansouri, Géographie physique et Quaternaire, 50 (1996) 185.
- [71] A. Berthod, Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications, Springer-Verlag.
- [72] J. Janicki, Le drame de la thalidomide: un médicament sans frontières, 1956-2009, Harmattan, 2009.
- [73] M. Meyring, B. Chankvetadze, G. Blaschke, Electrophoresis, 20 (1999) 2425.
- [74] J.-J. Lefrère, P. Berche, La Presse Médicale, 40 (2011) 301.
- [75] I. Azaïs, R. Brault, F.o. Debiais, Revue du Rhumatisme, 77 (2010) 21.

- [76] S.K. Branch, International Regulation of Chiral Drugs, in: Chiral Separation Techniques, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, pp. 317.
- [77] V. Wsol, L. Skálová, B. Szotáková, Curr. Drug Metab., 5 (2004) 517.
- [78] I. Agranat, H. Caner, Drug Discovery Today, 4 (1999) 313.
- [79] A.J. Hutt, J. Valentová, *J.*, Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 50 (2003) 7.
- [80] L. Thunberg, K. Öhlén, M. Lindskog, S. Karlsson, M. Klarqvist (AstraZeneca R&D), Poster session presented at 26th International Symposium on chiral Discrimination, Prague, République Tchèque, 2014.
- [81] H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern, Angew. Chem. Int. Ed., 53 (2014) 1218.
- [82] B. Lin, X. Zhu, S. Wuerthner, U. Epperlein, B. Koppenhoefer, Talanta, 46 (1998) 743.
- [83] T.J. Ward, Anal. Chem., 66 (1994) 632A.
- [84] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, A. Karlsson, O. Gyllenhaal, J. Chromatogr. A, 929 (2001) 101.
- [85] O. Gyllenhaal, A. Karlsson, Chromatographia, 52 (2000) 351.
- [86] M. Lämmerhofer, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 814.
- [87] M. Lämmerhofer, W. Lindner, J. Chromatogr. A, 741 (1996) 33.
- [88] J.T.L. Andy X. Wang, Thomas E. Beesley, LC GC North America, 18 (2000) 626.
- [89] Y. Zhang, W. Watts, L. Nogle, O. McConnell, J. Chromatogr. A, 1049 (2004) 75.
- [90] Y. Zhang, J. Dai, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, Chirality, 19 (2007) 683.
- [91] Z. Pirzada, M. Personick, M. Biba, X. Gong, L. Zhou, W. Schafer, C. Roussel, C.J. Welch, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 1134.
- [92] X. Han, A. Berthod, C. Wang, K. Huang, D.W. Armstrong, Chromatographia, 65 (2007) 381.
- [93] K. De Klerck, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, J. Chromatogr. A, 1326 (2014) 110-124.
- [94] M. Maftouh, C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y.V. Heyden, C. Picard, J. Chromatogr. A, 1088 (2005) 67.
- [95] Y. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, P. Sandra, J. Chromatogr. A, 1003 (2003) 157.
- [96] Z. Wang, M. Jonca, T. Lambros, S. Ferguson, R. Goodnow, J. Pharm. Biomed. Anal., 45 (2007) 720.
- [97] P.A. Mourier, E. Eliot, M.H. Caude, R.H. Rosset, A.G. Tambute, Anal. Chem., 57 (1985) 2819.
- [98] M. Kotake, T. Sakan, N. Nakamura, S. Senoh, J. Am. Chem. Soc., 73 (1951) 2973.

- [99] S. Yuasa, M. Itoh, A. Shimada, *J. Chromatogr. Sci.*, 22 (1984) 288.
- [100] H. Yoneda, *J. Chromatogr. A*, 313 (1984) 59.
- [101] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia*, 6 (1973) 277.
- [102] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A*, 1269 (2012) 26.
- [103] S.J. Grieb, S.A. Matlin, A.M. Belenguer, H.J. Ritchie, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 271.
- [104] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chem. Lett.*, 32 (2003) 850.
- [105] K. Lomsadze, G. Jibuti, T. Farkas, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A*, 1234 (2012) 50.
- [106] G. Guiochon, F. Gritti, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1915.
- [107] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1348 (2014) 87.
- [108] D.W. Armstrong, Poster session presented at 26th International Symposium on chiral Discrimination, 2014.
- [109] T. Shibata, T. Sei, H. Nishimura, K. Deguchi, *Chromatographia*, 24 (1987) 552.
- [110] E. Yashima, P. Sahavattanapong, Y. Okamoto, *Chirality*, 8 (1996) 446.
- [111] C.Y. Shunsuke Kondo, Masami Kamigaito, and Yoshio Okamoto, *Chem. Lett.*, 37 (2008) 558.
- [112] A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toga, *Chromatographia*, 19 (1984) 280.
- [113] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr. A*, 363 (1986) 173.
- [114] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chem. Lett.*, 22 (1993) 617.
- [115] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 670 (1994) 39.
- [116] M.W. Chris Hamman, Marc Jacob, Zachary S. Breitbach in: *LCGC Asia Pacific eNews*, 2012.
- [117] L. Miller, *J. Chromatogr. A*, 1256 (2012) 261.
- [118] A. Ghanem, L. Naim, *J. Chromatogr. A*, 1101 (2006) 171.
- [119] C. Minguillón, P. Franco, L. Oliveros, P. López, *J. Chromatogr. A*, 728 (1996) 407.
- [120] T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto, *Polym. J.*, 38 (2006) 91.
- [121] Y. Okamoto, R. Aburatani, S.-I. Miura, K. Hatada, *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (1987) 1613.
- [122] E. Yashima, H. Fukaya, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 677 (1994) 11.
- [123] N. Enomoto, S. Furukawa, Y. Ogasawara, H. Akano, Y. Kawamura, E. Yashima, Y. Okamoto, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2798.
- [124] T. Kubota, T. Kusano, C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chem. Lett.*, 30 (2001) 724.

- [125] C. Minguillón, P. Franco, L. Oliveros, P. López, J. Chromatogr. A, 728 (1996) 407.
- [126] T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, Y. Okamoto, J. Chromatogr. B, 875 (2008) 2.
- [127] E. Francotte, D. Huynh, J. Pharm. Biomed. Anal., 27 (2002) 421.
- [128] T. Zhang, C. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, H. Kurosawa, J. Chromatogr. A, 1075 (2005) 65.
- [129] A. Ghanem, H. Hoenen, H.Y. Aboul-Enein, Talanta, 68 (2006) 602.
- [130] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, J. Chromatogr. A, 1269 (2012) 336.
- [131] P. Macaudiere, M. Caude, R. Rosset, A. Tambute, J. Chromatogr. A, 405 (1987) 135.
- [132] P. Sun, C. Wang, Z.S. Breitbach, Y. Zhang, D.W. Armstrong, Anal. Chem., 81 (2009) 10215.
- [133] J. Vozka, K. Kalíková, C. Roussel, D.W. Armstrong, E. Tesarová, J. Sep. Sci., 36 (2013) 1711.
- [134] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, Anal. Chem., 66 (1994) 1473.
- [135] Y. Liu, A. Berthod, C.R. Mitchell, T.L. Xiao, B. Zhang, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, 978 (2002) 185.
- [136] A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquaric, C. Villani, A. Carotti, Anal. Chem., 72 (2000) 1767.
- [137] L. Miller, M. Potter, J. Chromatogr. B, 875 (2008) 230.
- [138] L. Miller, J. Chromatogr. A, 1250 (2012) 250.
- [139] W. Ren-Qi, O. Teng-Teng, N. Siu-Choon, T. Weihua, TrAC, Trends Anal. Chem., 37 (2012) 83.
- [140] L. Kott, American Pharmaceutical Review, 16 (2013) 26.
- [141] H. Awad, A. El-Aneed, Mass Spectrom. Rev., 32 (2013) 466.
- [142] M.A. Lindskog, H. Nelander, A.C. Jonson, T. Halvarsson, Drug Discovery Today, (2014).
- [143] K. Kalikova, T. Šlechtová, J. Vozka, E. Tesarova, Anal. Chim. Acta, 821 (2014) 1.

Une stratégie chémo-informatique pour décrire le mécanisme de reconnaissance chirale

L'objectif de ce chapitre pourrait être résumé à la figure 2.1 ci-dessous. Comprendre le mécanisme de reconnaissance chirale revient à l'aborder sous plusieurs aspects :

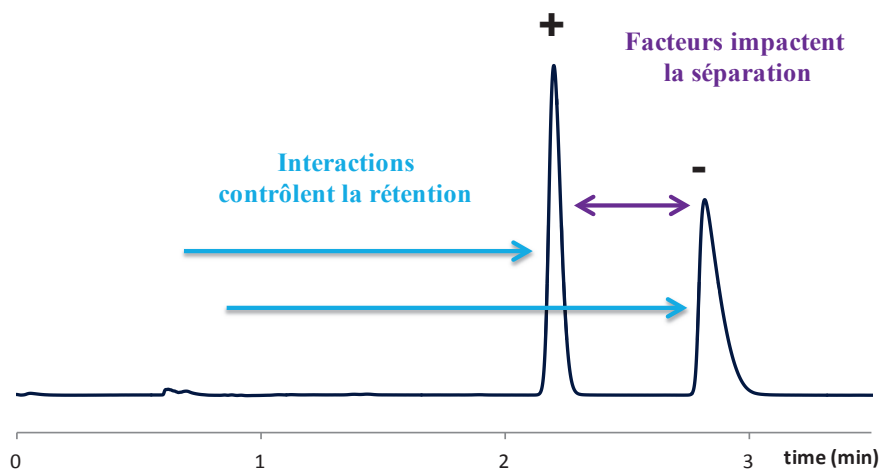


Figure 2.1 : Aborder le mécanisme de reconnaissance chirale sous deux aspects

- (i) identifier les interactions non-spécifiques qui contrôlent la rétention,
- (ii) identifier les facteurs stéréosélectifs qui contrôlent la séparation et
- (iii) identifier la configuration absolue des isomères.

Le mécanisme de reconnaissance chirale est depuis longtemps étudié par des méthodes spectroscopiques (RMN, diffraction par rayons X, fluorescence, dichroïsme circulaire), séparatives (HPLC, GC, SFC, CE) et de modélisation moléculaire.

Aujourd'hui la majorité des séparations d'énantiomères est réalisée par chromatographie chirale [1], avec notamment 12 000 cas répertoriés en 2013 sur la base de données Chirbase. *Face à une accumulation rapide de données, on pourrait alors se demander comment les utiliser pour comprendre, expliquer et prédire une séparation de stéréoisomères ?*

Afin de répondre à cette question et explorer les différents aspects du mécanisme de reconnaissance chirale, nous nous pencherons sur la méthodologie afin d'explicitier au mieux notre démarche : *comprendre le modèle des paramètres de solvation et l'analyse factorielle discriminante*. Quatre études présenteront ensuite l'utilisation de cette stratégie et son évolution

I. Une stratégie chémoinformatique

Une mise au point d'Alberto Del Rio décrit l'application des outils chémoinformatiques aux séparations énantiosélectives (modélisation du pharmacophore, Analyse comparative de champs moléculaires (*CoMFA*) et les relations quantitatives structure-propriété) [1]. Ces outils permettent d'établir des relations entre des données expérimentales et des algorithmes qui décrivent les propriétés moléculaires. Parmi ces techniques, notre étude considère les Relations Quantitatives Structure-Rétention.

1. Les Relations Quantitatives Structure-Rétention

Les Relations Quantitatives Structure-Rétention (QSRR) sont des « modèles mathématiques linéaires permettant de mettre en relation des paramètres physico-chimiques pour des molécules dont les descripteurs moléculaires (Annexe 1) sont connus ». La méthodologie est décrite dans la figure 2.2, d'après une mise au point de Roman Kaliszan [2,3].

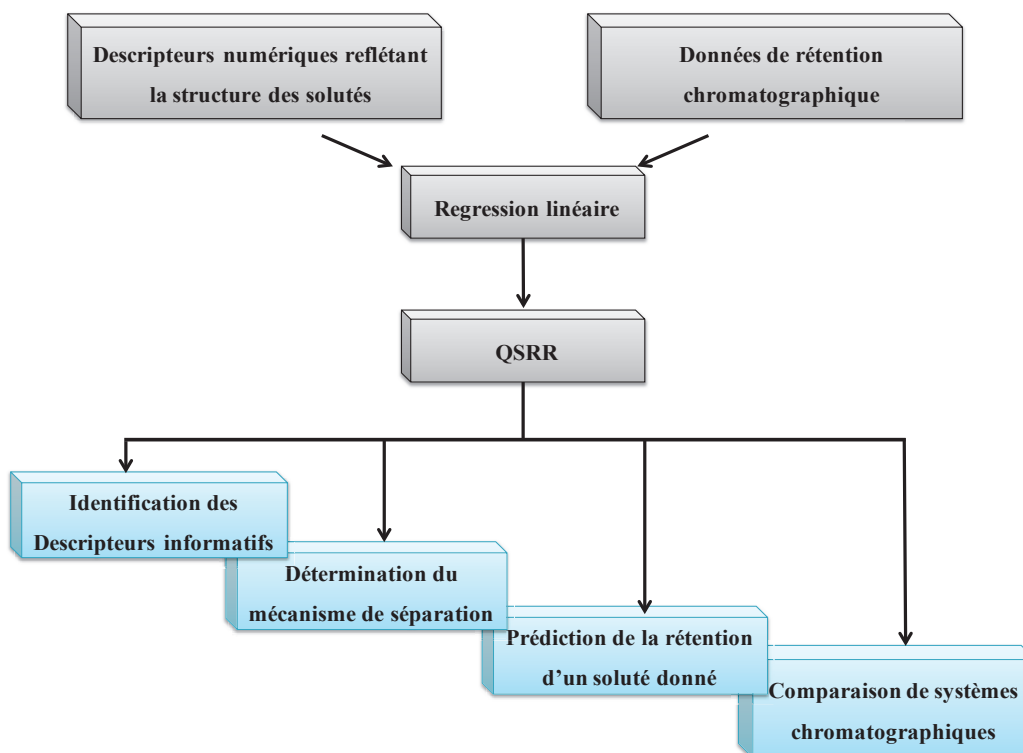


Figure 2.2 : Méthodologie des QSRR, d'après la Réf. [3]

Dans le cadre d'une comparaison quantitative de systèmes chromatographiques (phase stationnaire et phase mobile), l'approche la plus utilisée est de type LSER, pour « Linear Solvation Energy Relationship » (ou « relation linéaire de l'énergie de solvation ») [4-7]. Cependant, la difficulté est de construire des modèles statistiques ayant du sens. Proposé par Abraham [8,9] et retranscrit dans la mise au point de Vitha et Carr [10], le modèle LSER permet d'étudier la nature et la force relative des interactions contrôlant la rétention et la sélectivité chromatographique (équation 2.1).

$$\text{Log } k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (2.1)$$

Cette équation corrèle les données de rétention d'un large panel de composés aux descripteurs moléculaires (E, S, A, B, V) reflétant la structure des analytes, et aux coefficients (e , s , a , b , v) reflétant les propriétés de la phase mobile et de la phase stationnaire. Le terme c est l'ordonnée à l'origine et est dominé par le rapport de phase. E est la réfractivité molaire en excès (calculée à partir de l'indice de réfraction de la molécule) et représente la contribution de la polarisabilité de la molécule et des électrons π et non liants ; S est la polarité et, en partie également, la polarisabilité de la molécule ; A et B correspondent au caractère acide et basique, respectivement ; V est le volume de McGowan en unités de $\text{mol}^{-1}/100 \text{ cm}^3$. Les constantes du système (e , s , a , b , v) sont obtenues par une régression linéaire multiple des données de rétention mesurées pour un certain nombre de solutés avec descripteurs connus. Les différentes interactions sont représentées par les cinq constantes du système sur la figure 2.3.

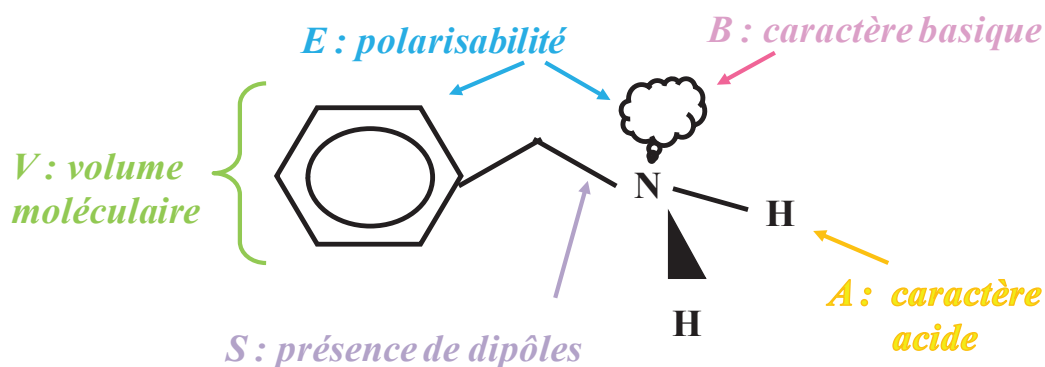


Figure 2.3 : Description des propriétés structurales et des interactions relatives au modèle LSER

Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour la création d'une classification d'environ 80 phases stationnaires, appliquée à la SFC non chirale, et représentée figure 2.4 [11].

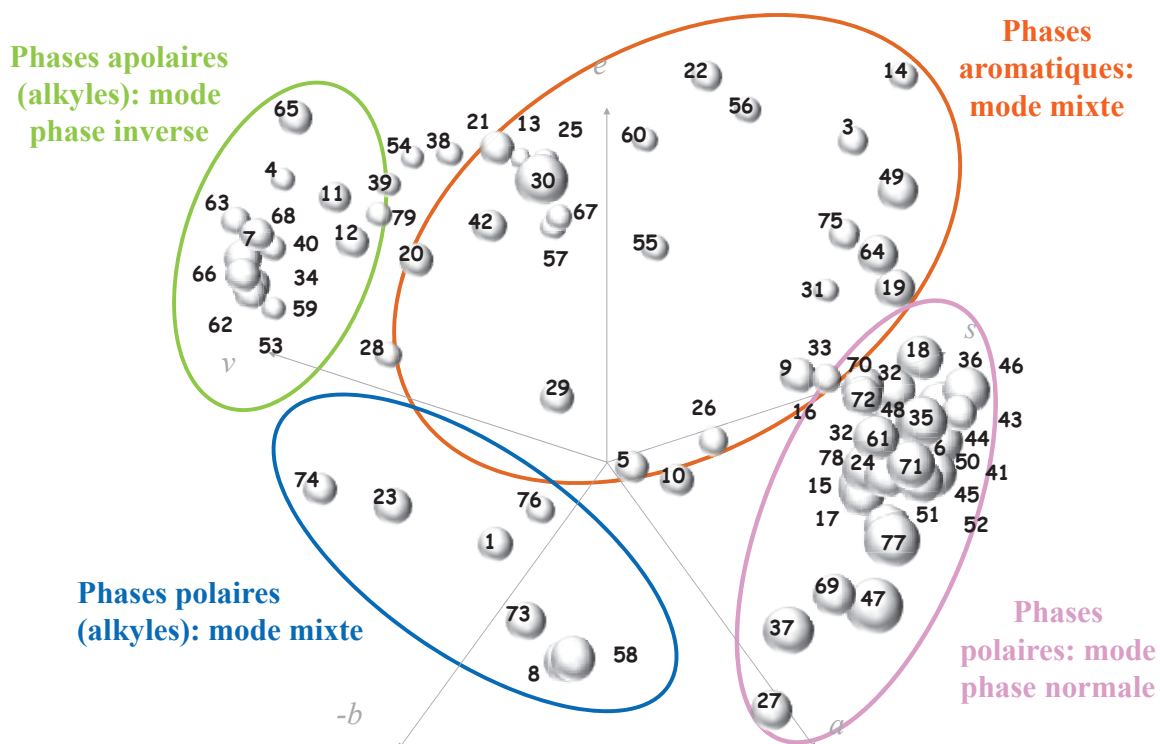


Figure 2.4 : Classification de phases stationnaires achirales en SFC. Conditions: CO₂ – méthanol 90:10 (v/v), 25°C, 150 bar, 3 ml/min [11]

Si les descripteurs d'Abraham sont utiles pour l'identification des interactions intermoléculaires, leurs applications sont limitées puisque :

- (i) **D'une part, ils ne sont applicables qu'aux espèces neutres.** La caractérisation de PS zwitterioniques en chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) a conduit à l'introduction de deux descripteurs (Equation 2.2) [12]. Leur contribution, à l'étude des interactions électrostatiques pour les analytes neutres, acides, basiques et amphotères, s'est révélée être pertinente.

$$\text{Log } k = c + eE + sS + aA + bB + vV + d^-D^- + d^+D^+ \quad (2.2)$$

où D⁻ et D⁺ représentent la charge portée par les espèces anioniques et cationiques, respectivement, ainsi que par les espèces zwitterioniques.

- (ii) **D'autre part, aucun descripteur d'Abraham n'est relatif à la forme ou à la stéréochimie du composé, éléments essentiels à la reconnaissance énantiosélective.**

2. Application aux séparations chirales

L'application de l'équation (2.1) à la compréhension du mécanisme de reconnaissance chirale a permis d'identifier les interactions non-spécifiques développées sur diverses chimies de PSC [15,13,14]. De ces études, il en découle naturellement les perspectives de l'exploration de *l'aspect tridimensionnel de ce mécanisme, sachant que les descripteurs 2D ne permettent pas de distinguer deux énantiomères* [15]. Les descripteurs de chiralité sont rarement utilisés car il est difficile de faire ressortir une interprétation intuitive et pertinente [16].

Dans le cadre de notre étude, deux descripteurs ont été identifiés afin d'appréhender les contraintes spatiales qui permettent l'accès des énantiomères vers les sites d'interactions : la flexibilité (F) et la globularité (G). L'équation (2.1) devient alors :

$$\text{Log } k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG \quad (2.3)$$

La flexibilité est un descripteur 2D (Voir annexe 1). Plus la molécule est flexible, plus le nombre de conformères est important, ainsi que le nombre d'interactions intermoléculaires, ce qui est généralement préjudiciable à la résolution énantiomérique. La globularité, qui est un descripteur 3D, permet, entre autres choses, de prendre en compte la résistance stérique à l'insertion dans les cavités chirales.

Cette méthodologie a d'abord été employée pour révéler les interactions contribuant à la rétention [17] les facteurs contribuant à l'énantioséparation [18] sur des PSC de type polysaccharide. En effet, Chiralpak AD et Chiralcel OD diffèrent par la nature du polymère, amylose vs. cellulose (Figure 2.5).

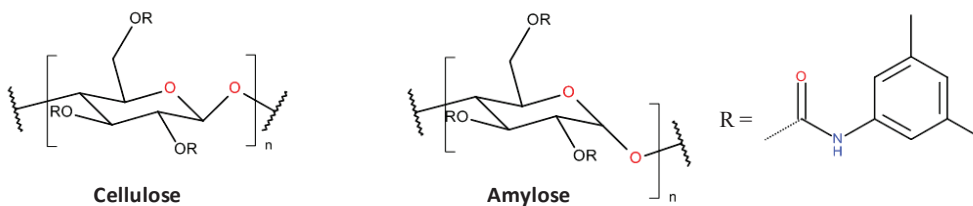


Figure 2.5 : Structure des supports à base de cellulose (Chiralcel OD) et d'amylose (Chiralpak AD)

Dans les deux cas, ils sont constitués d'unités D-glucose reliées par des ponts glucosidiques β -1,4 pour la cellulose et α -1,4 pour l'amylose. Cette différence mineure a un impact important sur la structure supramoléculaire des cavités chirales formées.

3. Analyse Factorielle Discriminante

Les capacités énantiosélectives des systèmes chromatographiques sont souvent associées à leurs performances (taux de succès, spécificités et complémentarités). Cependant, ces performances sont étroitement liées au set de molécules analysées. En effet, de petits changements structuraux impactent, de manière significative, les capacités de reconnaissance chirales [19]. Notre stratégie s'est alors focalisée sur l'influence de la structure moléculaire sur la séparation.

Associer le modèle des paramètres de solvation à une analyse factorielle permet d'explorer les facteurs contribuant à la séparation d'énantiomères. L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) est une méthode supervisée à la fois descriptive et prédictive. Elle consiste à identifier les « critères » qui permettent de discriminer au mieux les classes, formées au préalable.

Dans le cadre de notre étude, la démarche la plus intuitive consiste à séparer le jeu de composés en deux classes : racémiques séparés *versus* coélus (Figure 2.6) [20,21]. Cette démarche a été utilisée pour étudier le mécanisme de reconnaissance chirale de sélecteurs à base de cystéine. Des relations descriptives structure-rétention (RDSR) ont permis de mettre en évidence les propriétés structurales (indice de Shadow et Jurs) de l'analyte responsable de la séparation énantiosélective [21]. Une analyse factorielle discriminante, définie par 2 classes, a été appliquée avec succès sur Chiralpak AD et Chiralcel OD pour identifier les caractéristiques structurales communes aux racémiques séparés et coélus [21].

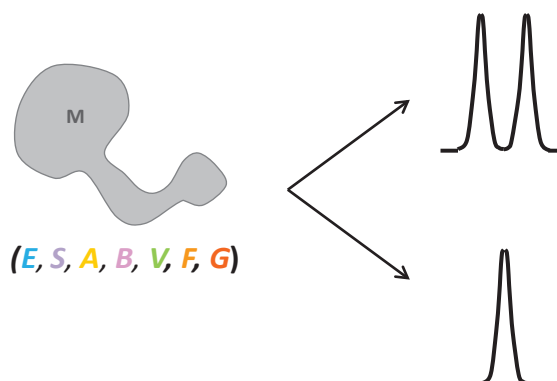
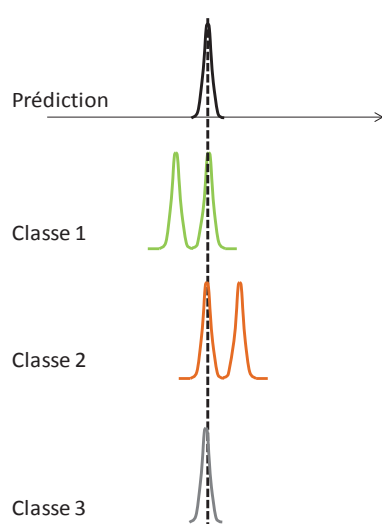


Figure 2.6 : Stratégie de l'AFD 2 classes

Face à un jeu de composés hétérogène, une deuxième stratégie a été proposée et repose sur les travaux de Mitchell, Armstrong et Berthod [5]. Elle repose sur l'idée que les capacités d'interaction résultant de la structure complète de la molécule impactent les possibilités pour la molécule chirale d'accéder à certaines cavités de reconnaissance énantiosélective. L'analyse d'un grand nombre de molécules non chirales permet de caractériser un système chromatographique et il en résulte une équation du type $\log k = f(e, s, a, b, v, f, g)$. Il est ensuite possible de prédire la rétention des racémiques, dont les descripteurs moléculaires sont connus. En comparant les logarithmes de rétention expérimentaux à ceux prédits, trois classes sont alors formées selon la figure 2.7 :



- (i) La classe 1 est composée de racémiques dont le premier énantiomère (E1) est élué avant la prédiction alors que le deuxième (E2) en est proche. Dans ce cas, les interactions E1/PSC sont limitées (encombrement stérique, répulsion).
- (ii) La classe 2 comprend des racémiques dont le deuxième énantiomère (E2) est élué après la prédiction. Il en résulte de fortes interactions E2/PSC
- (iii) La classe 3 contient les racémiques co-élués.

Figure 2.7 : Stratégie de l'AFD 3 classes

Dans ce chapitre, la méthodologie a été appliquée à un plus grand nombre de PSC de type polysaccharide. Elle a été associée à l'utilisation de méthodes d'analyse de données,

explicitées en annexe 2. Dans une première partie, les similarités/dissimilarités de PSC ayant un même sélecteur chirale sont mises en avant afin de savoir si les PSC dites « génériques » sont de véritables alternatives aux phases existantes. La deuxième partie compare de nombreux sélecteurs chiraux et discute de l'effet de la nature du sélecteur chirale sur les propriétés électroniques et l'environnement chirale. Enfin, la méthodologie a été appliquée à une phase de type Pirkle, Whelk-O1.

II. Application de la stratégie chémoinformatique à la caractérisation de phases stationnaires de type polysaccharide

Les résultats de la caractérisation de PSC « génériques » en chromatographie en phase supercritique sont rapportés dans l'article suivant :

Syame Khater, Yingru Zhang, Caroline West

In-depth characterization of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography

Journal of Chromatography A, 1303 (2013) 83-93



In-depth characterization of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography



Syame Khater^a, Yingru Zhang^b, Caroline West^{a,*}

^a Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, Pôle de Chimie, B.P. 6759, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

^b Bristol-Myers Squibb, P.O. Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08453-4000, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 15 June 2013

Accepted 17 June 2013

Available online 24 June 2013

Keywords:

Chemometrics

Chiral recognition

Polysaccharide-based chiral stationary phase

Quantitative structure–retention relationships

Solvation parameter model

Supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

Since the expiration of the patent protection of Chiralcel OD, similar chiral stationary phases (CSPs), all based on the same chiral selector, have been introduced on the market with the promise to reproduce or improve the performance of the original cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) CSP. We report here-in an in-depth evaluation of four generic versions of Chiralcel OD (CelluCoat, RegisCell, Lux Cellulose-1, Reprosil-OM) and the immobilized version (Chiralpak IB) in comparison to the original Chiralcel OD in terms of retention and enantioselectivity, with the help of chemometrics. First of all, the CSPs are compared based on the retentions of 230 achiral compounds. Agglomerative hierarchical clustering and quantitative structure–retention relationships based on a modified version of the solvation parameter model are used to assess the differences in non-enantioselective interactions contributing to retention. Secondly, the CSPs are compared based on the separation factors measured for 130 racemates. Discriminant analysis is then used to unravel the structural features contributing to the successful enantioselective separations. Chiralcel OD is shown to be the most versatile of the six tested CSPs, and involves a unique and unequalled mechanism to achieve enantioseparation.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Living organisms are based on a plethora of chiral molecules and often display different biological responses to drug enantiomers when they are dosed separately. The demands for new, more effective and safer therapeutical agents for the unmet medical needs and/or greater health and economic benefits are the driving forces of the development of enantiomerically pure drugs. That, consequently, propels the improvements in the field of enantioselective chromatography [1,2]. The preferred strategy to obtain enantiomerically pure compounds quickly, especially during drug discovery, is the use of an anisotropic system such as chiral stationary phases (CSPs) to resolve a racemic mixture. From a general point of view, transient diastereomeric complexes are created between each enantiomer and the chiral selector through varied interactions. The discrimination of the two enantiomers is based upon the difference of stability/internal energy between the transient diastereomeric complexes.

The most commonly used CSPs for chiral separations have long been the modified polysaccharide materials essentially developed by Okamoto, Francotte and co-workers, and later commercialized by Daicel Corporation. Among these CSPs, the original cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) (CDMPC) coated silica, namely Chiralcel OD, is versatile and displays a high resolving ability towards a wide range of racemates. The chemical structure of this polymer-type CSP used in the study is given in Fig. 1. Although several interesting chromatographic, spectroscopic, and computational studies have been reported, the chiral recognition mechanism of this polysaccharide-based CSP has not been completely elucidated [3]. Hesse and Hagel [4] and later Francotte et al. [5] proposed an inclusion mechanism. Booth and Wainer [6] described a mechanism based on three steps: (i) formation of transient complexes between a solute and a CSP through non-enantioselective interactions, (ii) stabilization of the complexes through additional interactions and (iii) discrimination between enantiomers due to a difference of conformation.

It is well established that CDMPC has a left-handed threefold (3/2) helix with modified D-(+)-glucose residues arranged along the main axis. The polar carbamate groups, located inside the chiral grooves, are considered as important adsorbing sites of the CSP and allow hydrogen bonding on the NH and C=O groups and

* Corresponding author. Tel.: +33 238494778; fax: +33 238417281.

E-mail addresses: caroline.west@univ-orleans.fr, west_caroline@yahoo.fr (C. West).

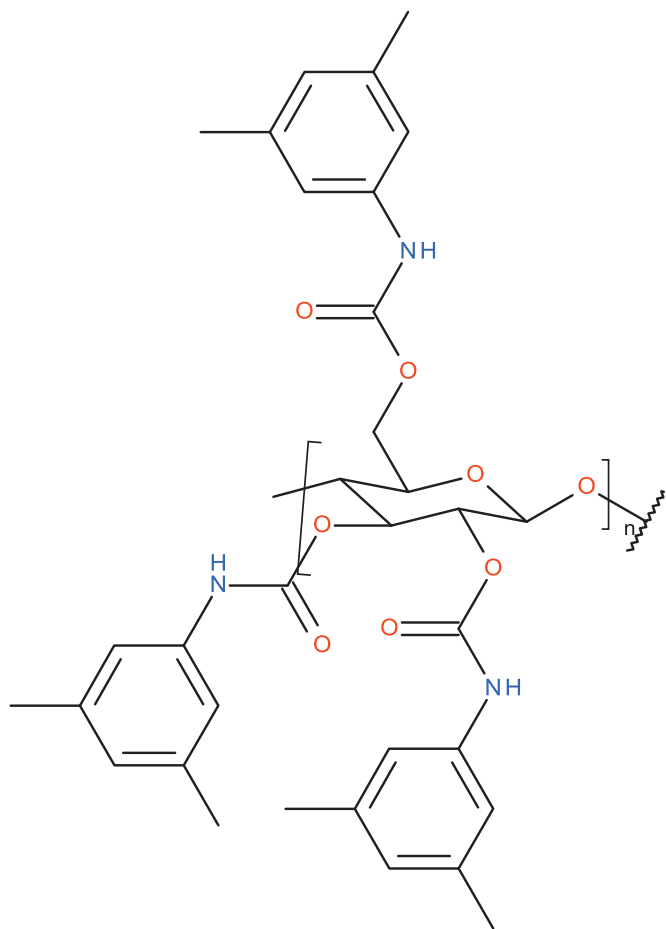


Fig. 1. The chiral selector based on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) of cellulose.

dipole–dipole interactions on C=O groups. The phenyl moieties are located outside of the polymer chain and also play a crucial role in the chiral resolution through π – π interactions.

Since the expiration of the patent protection of Chiralcel OD, over the recent years, a competitive market has been developed with the introduction of a number of “*a priori* equivalent” CSPs based on the same chiral selector cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate). This was termed “the year of the clones” by Beesley [7]. Kromasil CelluCoat (Akzo Nobel), RegisCell (Regis Technologies), Lux Cellulose-1 (Phenomenex) and Reprosil OM (Dr. Maisch) are silica-based CSPs coated with the same chiral selector. Chiralpak IB (Daicel) is a different version of the column chemistry with the polysaccharide immobilized onto the silica matrix by chemical bonding through a photochemical process. The immobilized phases overcome the solvent restriction of the coated CSPs, thus permit the use of a wide range of organic solvents as eluents that are particularly useful to achieve higher productivity at the preparative scale.

Various studies were carried out to study the enantioselective behaviour of chiral molecules using the original and “*a priori* equivalent” CSPs. De Klerck et al. observed that several different polysaccharide-based Daicel columns slightly outperformed their Phenomenex counterparts when used in supercritical fluid chromatography (SFC) with carbon dioxide–methanol-based mobile phases [8]. Nelander et al. compared the performance of five CDMPC-based CSPs, provided by different manufacturers, both in HPLC and SFC. The authors pointed out the similarities in terms of retention and enantioselectivity between Chiralcel OD and the generic CSPs [9].

In this paper, we present the in-depth characterization and comparison of six CSPs using supercritical fluid chromatography. The columns are compared in terms of their retention and separation characteristics, based on chemometric analyses with agglomerative hierarchical clustering (AHC), discriminant analysis (DA) and quantitative structure–retention relationships (QSRRs), namely the solvation parameter model. The latter model, also known as one of the linear solvation energy relationships (LSERs) has been widely used to understand the intermolecular processes controlling retention in chromatography [10,11]. More recently, several publications report the use of LSERs to characterize chiral stationary phases [12–14]. The aim of this research is to investigate the following points:

- Because various studies display the importance of non-enantioselective interactions in chiral separations, we wish to identify the characteristics of the main bonding sites involved between enantiomers and various cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) phases.
- We will highlight the differences in terms of retention and enantioselective separation and try to understand how an “*a priori*” identical molecular environment of chiral cavities could induce different chiral recognition mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Stationary phases

The columns of the study, kindly provided by varied manufacturers, were Chiralcel OD (Daicel Corporation, Tokyo, Japan), Kromasil CelluCoat (Akzo Nobel, Bohus, Sweden), RegisCell (Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL, USA), Lux Cellulose-1 (Phenomenex, Le Pecq, France), Reprosil OM (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) and Chiralpak IB (Daicel). The dimensions of the columns were 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m excepted for Lux Cellulose-1 and Reprosil OM for which the dimensions were 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, and Chiralpak IB 150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m.

The internal pressure was not exactly constant for all columns, as outlet pressure was identical for all columns but inlet pressure depends on column length and particle size. We observed that inlet pressure varied between 185 and 194 bar for all 5 μ m columns. It is thus expected that fluid density varies very little between these columns. Only Chiralpak IB, the only 3 μ m column, induced larger inlet pressures (about 220 bar). However, all analyses were carried out with low temperature and high back-pressure, and in such operating conditions, fluid compressibility is lessened, thus density variations should be minimized.

The differences in column length and particle size have no impact on the retention and separation factors measured in this study.

Because the columns do not all have the same dimensions, only retention and separation factors will be considered and not column efficiency or resolution.

2.2. Chemicals

Solvent used was HPLC grade methanol (MeOH) provided by J.T. Baker (Noisy-le-Sec, France). Carbon dioxide of industrial grade 99.5% was provided by Messer (Puteaux, France). Solutions of all test compounds were prepared in MeOH with concentrations in the range of 100–1000 ppm. 230 achiral compounds were obtained from a range of suppliers. The majority of the 130 racemates were from commercial sources while a small proportion of them were in-house synthesized products whose structures are confidential. The complete lists of compounds can be found in our previous works [14,15].

2.3. Chromatographic systems

Analytical SFC was performed on two instruments: achiral analyses were carried out on the Jasco system, chiral analyses were carried out on the Waters system. The difference in the equipments should not have any impact on the retention and separation factors measured in the study. Indeed, we verified that retention and separation factors were not significantly affected when changing from one system to another. Only 25 cm columns experienced a small increase in inlet pressure (typically 15 bar) when used in the large Waters oven.

2.3.1. Jasco SFC system

On the equipment manufactured by Jasco (Tokyo, Japan), two model 2080-PU pumps were used, one for carbon dioxide and a second for the modifier. Control of the mobile phase composition was performed by the CO₂ pump. The pump head used for pumping the carbon dioxide was cooled to −5 °C. When the two solvents (methanol and CO₂) were mixed, the fluid was introduced into a dynamic mixing chamber model 811 (Villiers-le-Bel, France) connected to a pulsation damper (Sedere, Orleans, France). The injector valve was supplied with a 20 µL loop (model 7725 Rheodyne, Cotati, CA, USA). The columns were thermostated by an oven (Jetstream 2 Plus, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA), regulated by a cryostat (Haake D8 GH, Karlsruhe, Germany). The detector was a Gilson UV-151 detector equipped with a pressure-resistant cell. The detection wavelength was 220 nm. After the detector, the outlet column pressure was controlled by a Jasco BP 2080 Plus pressure regulator. The outlet regulator tube (internal diameter 0.25 mm) was heated to 60 °C to avoid ice formation during the CO₂ depressurization. Chromatograms were recorded using the Azur software (Datalys, France).

2.3.2. Waters acquity UPC² system

The Acquity UltraPerformance Convergence Chromatography™ was equipped with a binary solvent delivery pump compatible with mobile phase flow rates up to 4 mL min^{−1} and pressures up to 414 bar, an autosampler that included partial loop volume injection system, a backpressure regulator, two column ovens (one for 15 cm columns, another one for 25 cm columns), one compatible with 150 mm length columns and a range of temperature between 4 and 90 °C and the other one compatible with 250 mm length columns, and a PDA detector.

In all cases, the mobile phase used in this study is CO₂–MeOH 90:10 (v/v). Flow rate was 3 mL min^{−1}. Temperature was set at 25 °C and the outlet pressure was maintained at 150 bar for all columns. We must however point out that the mobile phase will not be absolutely identical in all columns compared because longer column lengths and smaller particle sizes induce higher inlet pressure. However, because the back-pressure applied was relatively large (150 bar) and the fluid is modified with a significant proportion of methanol (10%), density variations from column to column should be limited.

Injection volume was 1 µL for all compounds. Retention factors (*k*) were calculated based on the retention time *t_R*, determined using the peak maximum (even when tailing did occur, for some of the basic compounds) and on the hold-up time *t₀* measured on the first negative peak due to the unretained dilution solvent.

2.4. Data analysis

All multivariate data analyses were performed using XLStat 7.5 software (Addinsoft, New York, NY). The quality of the QSRR fits was estimated using the overall correlation coefficient (*r*), adjusted determination coefficient (*R*_{adj}²), standard error in the estimate (SE)

and Fischer *F* statistic. The statistical significance of individual coefficients was evaluated using the *t*-ratio, which is defined as the ratio of the regression coefficient to its standard error. The quality of Discriminant Analyses (DAs) was estimated based on ROC (receiver operating characteristics) curves and confusion matrices.

In our previous works, a modified version of the solvation parameter model has been used to describe the intermolecular interactions and steric features of six CSPs [14,15] using the following Eq. (1):

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG \quad (1)$$

In this equation, capital letters represent the solute descriptors, related to particular structural features, while lower case letters represent the system constants, related to the complementary effect of the phases on these interactions. *c* is the model intercept term and is dominated by the phase ratio. *E* is the excess molar refraction (calculated from the refractive index of the molecule) and models polarizability contributions from *n* and *π* electrons; *S* is the solute dipolarity/polarizability; *A* and *B* are the solute overall hydrogen-bond acidity and basicity; *V* is the McGowan characteristic volume in units of cm³ mol^{−1}/100; *F* is the flexibility of the molecule, calculated as the fraction of rotatable bonds; *G* is the globularity, qualifying the compactness of the molecule. We previously reported the introduction of two 3D descriptors (*F* and *G*) in addition to Abraham descriptors to better meet the requirements of enantioseparations [14,15]. Flexibility is important for chiral resolution because flexible molecules have more conformers, thus more ways for intermolecular interactions, which is generally detrimental to enantioresolution. Globularity can be related to steric impedance to insertion into the stationary phase but also to the possibility for a small molecule to better fit on the walls of a spherical cavity thus establish several interactions at a time. Both flexibility and globularity notions are totally absent from Abraham descriptors.

The system constants (*e*, *s*, *a*, *b*, *v*, *f*, *g*), obtained through a multilinear regression of the retention data for a certain number of solutes with known descriptors, reflect the magnitude of difference for that particular property between the mobile and stationary phases. Thus, if a particular coefficient is numerically large, then any solute having the complementary property will interact very strongly with either the mobile phase (if the coefficient is negative) or the stationary phase (if the coefficient is positive).

E, *S*, *A*, *B* and *V* solute descriptors were extracted from an in-house database established from all available literature on the solvation parameter model. Additional descriptors (*F* and *G*) were computed in-house as described in [14]. The complete table of descriptors for achiral and chiral compounds can be found in previous papers [14,15].

3. Results and discussion

3.1. Overall performance and success rate

3.1.1. Comparison of all phases

As a new CSP is considered to be introduced into a general enantioselectivity screening, it is required that it would either provide a high success rate in the separations for a wide range of racemates or offer orthogonal selectivity as compared to other CSPs used for the screening.

It is interesting to compare the six CSPs based on their chromatographic performances on the 130 racemates used in this study under the predefined experimental conditions.

The bar chart in Fig. 2a presents the overall ability of a CSP to separate the enantiomers while Fig. 2b presents the specificity of a CSP in terms of unique hits (defined as one successful separation with *α* > 1) as compared to the reference column (Chiralcel OD).

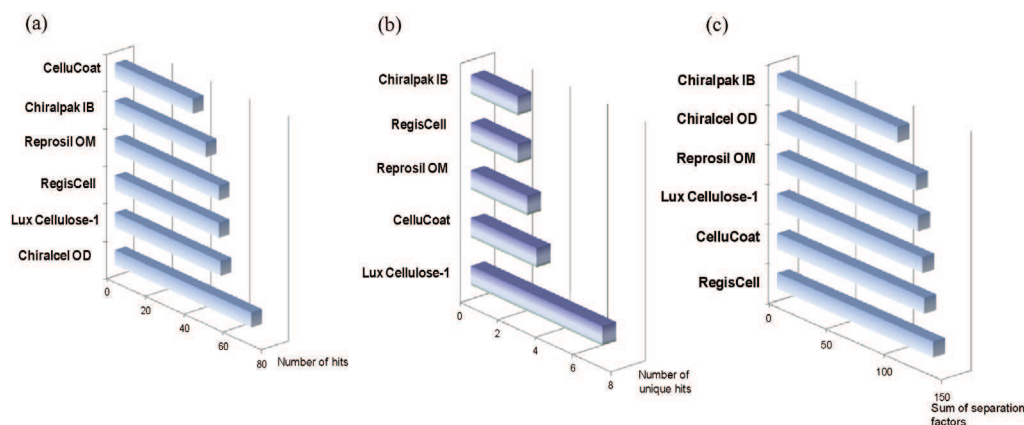


Fig. 2. (a) Percentage of separated enantiomers on each tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) of cellulose CSP, from the initial set of chiral compounds. (b) Specificity of the CSP: number of separated enantiomers obtained only on the given CSP compared to Chiralcel OD. (c) Classification of the columns comparing the separation factors on each column for a particular racemate.

The Chiralcel OD column provides both the highest success rate (70%) and the highest number of unique separations (6 separations achieved only on Chiralcel OD and not on any of the other five columns). Comparing Chiralcel OD to each column taken individually, the number of unique hits on Chiralcel OD varies between 24 and 40 racemates, which represents 18–33% of the data set.

Considering all six CSPs evaluated, Lux Cellulose-1 and RegisCell seem to offer closer performance, and could be considered as first choice as alternative phases to Chiralcel OD. RegisCell and Chiralcel OD have more separated enantiomers in common than Lux Cellulose-1. Pirzada et al. [16] evaluated the separation performance of several columns including Chiralcel OD, CelluCoat and RegisCell in SFC using a standard library of forty-eight racemates. In their study, RegisCell provided comparable performances and often better separations than the original CSP.

Lux Cellulose-1 shows similar behaviour but its own characteristics make it more unique than RegisCell in comparison to Chiralcel OD. In HPLC, Younes et al. [17] considered that the Phenomenex columns showed additional enantioselectivities compared to Daicel ones and could be considered for a screening instead of Chiralcel OD. De Klerck et al. [8] reported that the difference in success rate is partly due to stronger retention on Lux Cellulose-1. Fig. 3 compares the logarithm of retention factor of the first enantiomer on Lux Cellulose-1 ($\log k(E1)_{\text{lux cellulose-1}}$)

to the logarithm of retention factor of the first enantiomer on Chiralcel OD ($\log k(E1)_{\text{chiralcel OD}}$). The majority of the compounds are located below the first bisector (interrupted line), indeed indicating higher retention on Lux Cellulose-1. A similar trend was observed for the second enantiomer.

The CelluCoat column displays the lowest enantioselectivity but it seems more specific towards particular racemates. For instance, diltiazem and norephedrine were only resolved on this phase. Ilisz et al. [18] have compared the separation performances of CelluCoat and Chiralcel OD on aminonaphthol analogues. They found CelluCoat the better choice for this particular family of compounds.

Another possible ranking of columns is presented in Fig. 2c. It is based on the sum of separation factors. The column with the highest sum is the one providing the highest performance in terms of separation factors. Chiralcel OD, showing the highest success rate (Fig. 2a), provides the smallest sum of separation factors. RegisCell provides the largest sum of separation factors while it has a lower success rate compared to Chiralcel OD. CelluCoat is also surprising as it provided the lowest overall success rate (Fig. 2a) but close ranking score compared to RegisCell (Fig. 2c). This figure indicates that, when enantioseparation occurs, the generic columns often provide larger separation factors than Chiralcel OD. This indicates that, even if CelluCoat provided enantioseparation for the smallest number of racemates, the separation factors were usually larger than for the other columns. These details should be relevant at the preparative scale.

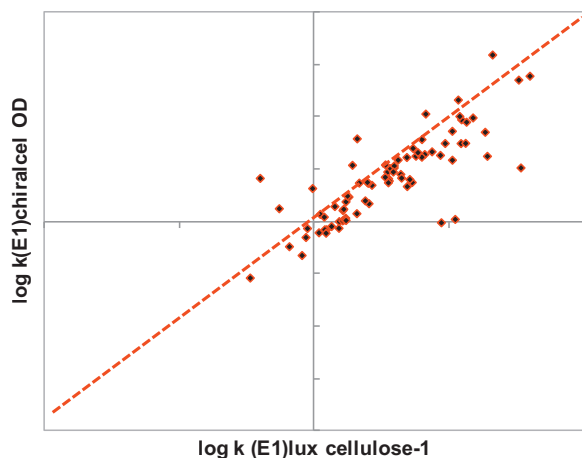


Fig. 3. κ – κ plots comparing the retention of the first enantiomer on Lux Cellulose-1 to Chiralcel OD. The red line corresponds to the first bisector. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.1.2. Focus on Chiralcel OD vs. Chiralpak IB

Several investigations have been carried out to immobilize the polysaccharide derivatives onto silica gel in order to enhance the application scope, for the compatibility with a wide range of solvents and the stability of the CSPs [2,19–21]. In 2004, Daicel commercialized the first immobilized CSPs, including Chiralpak IB.

Chiralpak IB is considered as the immobilized version of Chiralcel OD [22]. In this study, 119 racemates were screened on both phases using 10% methanol in carbon dioxide. Under these conditions, the percentage of separated compounds is presented in Fig. 4. A large proportion of the racemates were separated on Chiralcel OD (70%) while Chiralpak IB shows a success rate of 47%. Moreover, the coated phase displays a high specificity towards 27% of the racemates compared to only 3% of racemates on the immobilized version. Besides, we observed higher separation factors in Chiralcel OD, as shown in Fig. 2c.

Although the chiral selector is the same, various studies have proven that Chiralpak IB behaves differently compared to Chiralcel OD using “standard” solvents (typically alcohol).

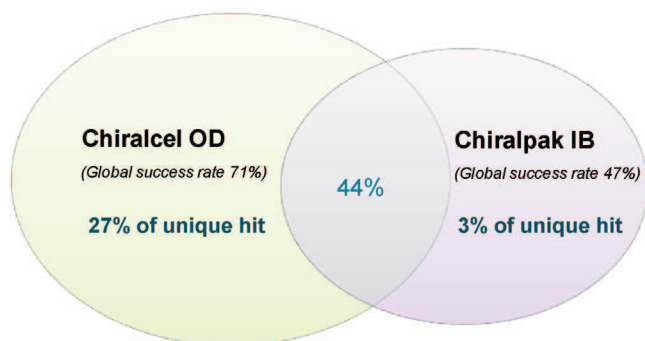


Fig. 4. Comparison of the success rate between Chiralcel OD and Chiralpak IB.

Jin and co-workers [23] have presented the chromatographic behaviour of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on immobilized CSPs (Chiralpak IA, IB and IC) and coated-type CSP (Chiralpak AD and Chiralcel OD). The coated versions showed a greater enantioresolution compared to the homologous immobilized CSPs. They proposed that the immobilization process affected the ordered arrangement of the structure and might cause the decrease of selectivity of the immobilized CSPs.

However, on the other hand, organic solvents used in the SFC mobile phase are a critical parameter in developing enantioseparation. The compatibility with a wider range of solvents presents a significant advantage of the immobilized CSPs to not only obtain enantioselectivity but also on the stability and lifetime of the CSP.

It is important to point out that the performance of Chiralpak IB may be underestimated since the pre-defined conditions used in the study do not take the advantage of solvent compatibility of the Chiralpak IB. The performances of Chiralpak IB would be fully exploited under “non-standard” mobile phase conditions in order to afford new enantioselectivity profile.

In the above discussion, we supposed a difference in the silica treatment between these two columns. Zhang et al. [24] discussed about the effect of mobile phase additives on chiral separation and observed a positive effect of acidic additives for the analysis of basic compounds, mostly on Chiralpak IB. The authors supposed (i) the formation of ion-pair complex between the anionic additive and the basic solute and/or (ii) the dynamic coating of the acidic additive on the stationary phase. This finding can be related to a possible difference in silica treatment between Chiralpak IB and Chiralcel OD. Fig. 5 illustrates the analysis of two basic compounds (verapamil and bupivacaine) in CO_2 –MeOH (90:10, v/v) without additives on both Chiralpak IB and Chiralcel OD. Fig. 5 illustrates the analysis of two basic compounds (verapamil and bupivacaine) in CO_2 –MeOH (90:10, v/v) without additives on both Chiralpak IB and Chiralcel OD. On the Chiralpak IB, the chromatograms display broad, tailing peaks that reduce enantioselectivity and resolution. An acidic additive (as formic acid) might act as suppressor of undesired achiral interactions resulting from the modified silica surface.

3.2. Achiral comparison: non-enantioselective interactions contributing to retention

A combination of both enantiospecific and non-enantiospecific interactions contributes to an enantioseparation where non-enantiospecific interactions would contribute mostly to the retention and a difference in enantioselective interactions between the two enantiomers with the CSP would drive the enantioseparation. Hence, we measured non-enantioselective interactions first.

3.2.1. Based on agglomerative hierarchical clustering

Agglomerative hierarchical clustering (AHC), a chemometric method, identifies groups of observations that display similar characteristics. In our case, the groups of observations are the CSPs, and the characteristics are the retention properties. Because no prior knowledge of which observation belongs to which cluster is needed, this technique is useful to obtain a global visualization of the relationship between the observations.

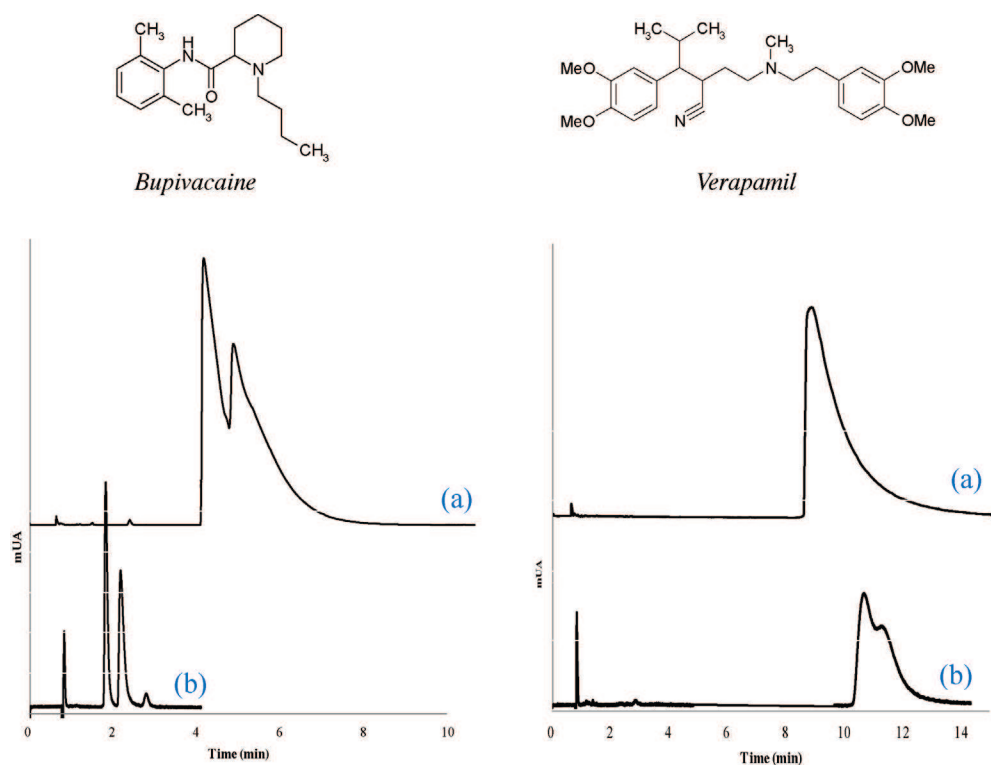


Fig. 5. Analysis of basic compounds (bupivacaine and verapamil) without additives on both (a) Chiralpak IB and (b) Chiralcel OD.

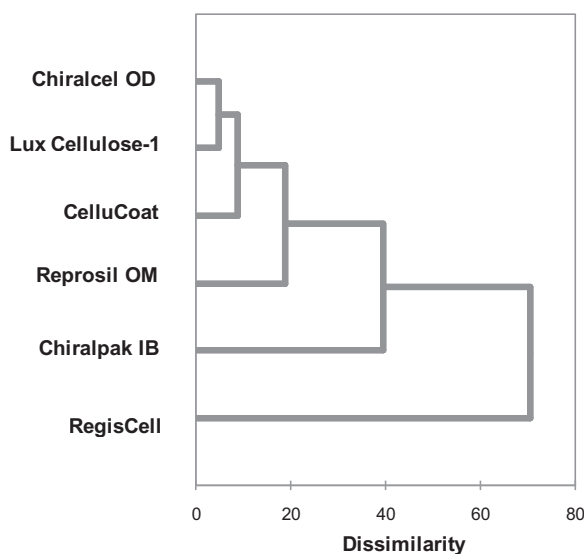


Fig. 6. Agglomerative hierarchical clustering based on the logarithm of 175 normalized retention factors of the set of achiral compounds. Dissimilarity was measured as the Euclidean distance between the columns.

An AHC has been performed based on the retention factors of the achiral test compounds in order to classify the CSPs in their ability to interact with the solutes *via* chemical interactions. Ward's method was used to cluster the normalized data, and the Euclidean distance defined the distance between two clusters.

From the initial solute set, 175 achiral compounds were used. They correspond to those whose retention factors were calculated on *all* columns. In obtaining retention data, some compounds needed to be eliminated because of their ambiguous peak identities due to deteriorated peak shapes, degradation or lack of elution.

A hierarchical tree diagram, namely dendrogram (Fig. 6), represents how the algorithm defines the level of dissimilarity between the phases in terms of *retention of achiral species*. The columns can be divided into three groups. (i) Chiralcel OD, Lux Cellulose-1, CelluCoat, Reprosil-OM, (ii) Chiralpak IB and (iii) RegisCell. Because Lux Cellulose-1, CelluCoat and Reprosil-OM show close retention behaviour to Chiralcel OD, the reference column, they possess similar non-enantiospecific interactions with the test achiral compounds. Chiralpak IB and RegisCell are different from each other and display the most different behaviour among the tested columns compared to the reference column.

These observations raise the following question: what makes these phases different from the original one? Since AHC provides only a ranking of similarities, with no insight in the causes for the proposed classification, we used the modified solvation parameter model for an in-depth understanding of the interactions between the solute and the CSPs at the molecular level.

3.2.2. Based on the modified solvation parameter model

The investigations of non-enantioselective interactions that control retention are based on the screening of 230 achiral compounds on six CSPs. Table 1 indicates the statistical features of the calculated models. The quality of the fits was estimated using the adjusted determination coefficient (R^2_{adj} ranged between 0.83 and 0.91), standard error in the estimate (ranged from 0.14 to 0.20) and Fischer *F* statistic (from 209 to 403). Statistical significance of each individual coefficient to explain retention was assessed using the *t*-ratio, which is defined as the ratio of the regression coefficient to its standard error. Coefficients that were not significant, at the 95% confidence level, were eliminated from the model and are indicated as non significant in Table 1. Graphs of the residuals

(difference between the experimental and predicted $\log k$ values) plotted against $\log k$ or against the values of each individual descriptor showed no correlation. From the initial set, some compounds had to be eliminated (as mentioned in the previous section), or were considered as outliers in the multiple linear regression analysis, but in any case the number of compounds remaining in the final regression is always very large (from 172 to 211). For the complexity of the systems characterized, these results are reasonably good, although the statistical quality is not as good as usually observed on non-enantioselective chromatographic systems with achiral stationary phases [25,26].

Fig. 7 presents the system constants obtained for each CSP. Retention on cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) could be explained by the sum of direct intermolecular interactions and stereo-induced interaction features. In all phases, retention results from π - π interactions (*e*), hydrogen bonding (*a*, *b*) and steric features (*f*, *g*).

The *e* coefficient is the largest contributor to retention, which essentially means strong π - π interactions between aromatic solutes and phenyl or carbonyl groups of the CSP. Considering the correlation between the *e* and *s* coefficients and because the *s* coefficient was found not significant in all cases, it is also possible that induced dipole-dipole interactions contribute to the large *e* values observed.

It is well known that hydrogen bonding plays a crucial role in chiral discrimination on this type of CSPs. Our results show that interaction with a hydrogen donor is a significant feature contributing to retention (large *a* values), while interaction with a hydrogen acceptor is of secondary importance (lower *b* values). The carbamate function likely acts as a hydrogen-donor and -acceptor through the carbonyl and -NH- groups. Accessible residual silanols may also contribute to the interactions with the solutes. Another explanation is that the silica surface for the coated CSPs may be modified with ligands of some sort, as aminopropyl-bonded chains, before the polysaccharide coating. Similar measurements made on silica and aminopropyl-bonded silica phases indicate that, on the latter phases the *a* coefficient is usually larger than the *b* coefficient, while the contrary is true for the former phases [27]. Thus aminopropyl groups on the silica base may as well contribute to the large *a* and small *b* values observed here. Finally, methanol molecules adsorbed onto the surface of the CSP may contribute to the *a* and *b* terms as well. This last point will be further discussed in future works investigating the influence of mobile phase modifier in chiral SFC separation.

On all six columns, the *v* coefficient is not found to be significant to explain retention. This indicates that whatever the molecular volume of the solute (*V*), it would have the same probability to interact with the CSP (no impact on retention). However, structural features, such as flexible adaptability (*F*) and steric resistance to insertion (*G*), appear to be significant.

A detailed description of the cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) retention model is available in our previous study [14]. In the present study, we focus on the differences in the retention behaviour that could have an impact on enantioselectivity.

All system constant appears to be slightly larger on Lux Cellulose-1 than on Chiralcel OD. That indicates stronger solute-CSP interactions resulting in longer retention. This information has to be taken into consideration in the preparative scale. When a more retentive column is used that provides a large chiral resolution, the percentage of modifier in the mobile phase can be increased to decrease the analysis time, which usually favours sample solubility therefore allows injecting concentrations providing improved productivity.

A decreased *e* value is observed for Chiralpak IB and RegisCell while *a* and *b* values increase compared to the others phases. This

Table 1

The system constants obtained from the multiple linear regression analysis for each CSP.

	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>n</i>	R^2_{adj}	SE	<i>F</i>
Chiralcel OD	0.815 <i>0.025</i>	ns	0.406 <i>0.025</i>	0.122 <i>0.026</i>	ns	ns	−0.158 <i>0.025</i>	200	0.882	0.141	372
Lux Cellulose-1	0.850 <i>0.029</i>	ns	0.450 <i>0.027</i>	0.176 <i>0.029</i>	ns	0.162 <i>0.028</i>	−0.063 <i>0.027</i>	191	0.884	0.154	291
Cellucoat	0.818 <i>0.030</i>	ns	0.340 <i>0.031</i>	0.152 <i>0.034</i>	ns	ns	−0.113 <i>0.032</i>	211	0.832	0.195	209
Reposil OM	0.826 <i>0.024</i>	ns	0.465 <i>0.024</i>	0.123 <i>0.024</i>	ns	ns	−0.162 <i>0.023</i>	173	0.909	0.138	430
Chiralpak IB	0.736 <i>0.026</i>	ns	0.531 <i>0.024</i>	0.262 <i>0.026</i>	ns	0.072 <i>0.026</i>	−0.124 <i>0.024</i>	186	0.910	0.141	373
RegisCell	0.725 <i>0.034</i>	ns	0.560 <i>0.030</i>	0.177 <i>0.035</i>	ns	0.117 <i>0.032</i>	−0.070 <i>0.033</i>	172	0.863	0.166	216

The numbers in italics represent standard errors. ns stands for “not significant”. *n* is the number of solutes considered in the regression. R^2_{adj} is the adjusted correlation coefficient. SE is the standard error in the estimate, *F* is Fischer’s statistic.

indicates less interaction with aromatic solutes and more interaction with acidic and basic ones. A possible explanation for RegisCell is that the amount of coated polysaccharide is less in this column than that in the other coated phases. Similarly for Chiralpak IB, it is reasonable to believe that the amount of polysaccharide in the immobilized column is less than that in the coated columns. As a result, there would be proportionally less aromatic groups and more silica surface (or aminopropyl-bonded groups from the modified silica surface) available for interaction with the analytes in these two CSPs.

Another explanation is that the modification of the cellulose polysaccharide with phenylcarbamate groups was not achieved to the same extent: possible remaining hydroxyl groups may contribute to differential interactions.

Based on the existing patents for immobilized polysaccharide CSPs, the methods used are numerous and are possibly different for each immobilized phase currently commercialized, as the chemists must have tested a variety of processes and finally opt for the one providing the best stationary phase. The process used for immobilization of the polysaccharide in the particular case of Chiralpak IB is unknown to us but likely involves an initial modification of silica prior to the deposition or bonding of the polysaccharide. The bonded group may not be aminopropyl in this case, but some other functional group. Unreacted groups may thus cause extra hydrogen bonding as compared to the coated version of the CSP. Unmodified hydroxyl groups of the polysaccharide may also contribute to different hydrogen bonding.

Another hypothesis comes from the significant and positive value of the *f* coefficient observed for Chiralpak IB as compared

to Chiralcel OD. This indicates that flexible molecules are more retained than rigid ones. A concomitant observation is that the negative *g* coefficient is smaller on IB than on OD, suggesting that steric resistance to insertion is lessened in the immobilized version. A possible explanation for these two observations is that interaction sites of the chiral grooves in Chiralpak IB may be easier to reach, thereby increasing the possibilities for hydrogen bonding interactions with carbamate groups, and not so much limited to interaction with pendant phenyl groups.

To validate the above hypotheses, retention data obtained on the CSPs is compared based on κ – κ plots.

3.2.3. Based on κ – κ plots

The κ – κ plots compare the logarithms of retention factors of 168 achiral compounds on RegisCell (Fig. 8a) and 173 achiral compounds on Chiralpak IB (Fig. 8b) vs. Chiralcel OD. Since the phases are based on the same chiral selector, the high correlation coefficients observed ($R^2 = 0.89$) were not unexpected. A closer look on the graph comparing RegisCell to Chiralcel OD (Fig. 8a) shows that the majority of the compounds are located below, and in a parallel fashion to the first bisector (interrupted red line), indicating a probable difference in phase ratio between the two phases. This observation is consistent with the above hypothesis that there is probably a larger amount of polysaccharide available on the original phase.

If we now consider the linear regression line (black line), the compounds located above this line are acidic, basic or non aromatic indicating that acidic and basic species are more retained on RegisCell than on Chiralcel OD, while aromatic species are more retained

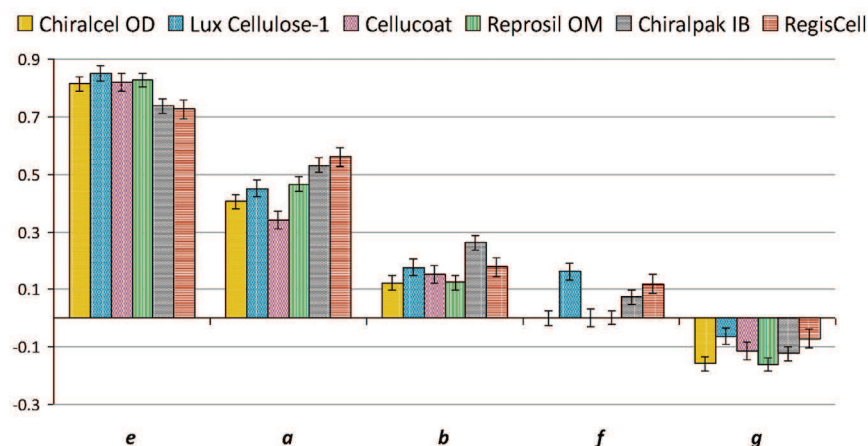


Fig. 7. The significant system constants (*e*, *a*, *b*, *f* and *g*) issued from the multiple linear regression analysis compared for the six columns. Each bar represents the contribution of a given interaction to retention. See text for details.

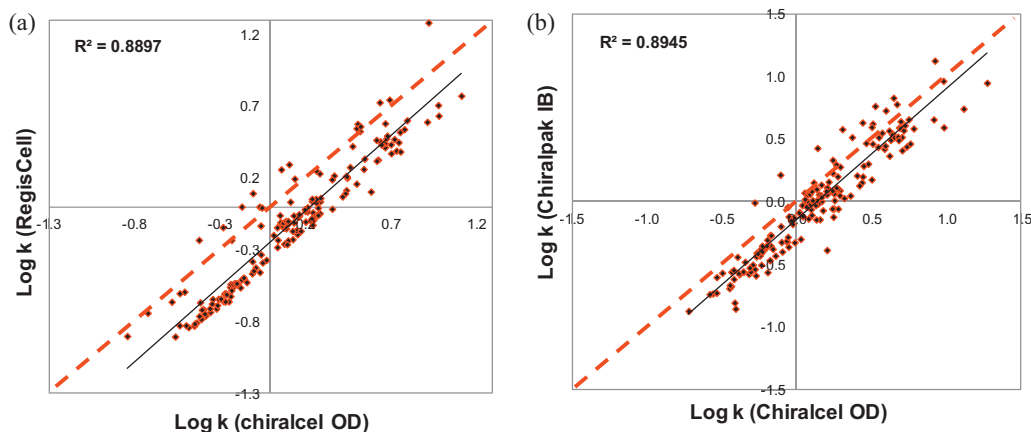


Fig. 8. Comparison of two CSPs based on $\log k$ – $\log k$ plots. (a) RegisCell vs. Chiralcel OD (b) Chiralpak IB vs. Chiralcel OD. The interrupted red line (the first bisector) represents a theoretical identical behaviour between the phases. The black line is the linear regression line. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

on Chiralcel OD. This last result is in accordance with the above model in which a and b -values were increased and e -value was decreased. In RegisCell phase, the compounds would interact preferentially through hydrogen bonding interactions, probably with the silica support or with uncovered aminopropyl groups on the silica surface. Moreover, polycyclic aromatic hydrocarbons are all situated below the line, indicating more aromatic sites on Chiralcel OD.

To sum up, there are less aromatic sites but more hydrogen bonding ones on RegisCell compared to Chiralcel OD. It is likely that the excess hydrogen bonding is from something else besides the carbamate moieties, otherwise π – π interactions should also be larger on RegisCell. We suppose a significant impact of silica or bonded groups on the non-enantioselective interaction involved in the chiral mechanism, probably resulting from a smaller amount of polysaccharide on RegisCell.

Similar observations can be done on the graph comparing Chiralpak IB to Chiralcel OD (Fig. 8b) and reveal similar interpretations.

3.3. Chiral characterization: factors contributing to enantioseparation

3.3.1. Based on agglomerative hierarchical clustering

An AHC has been performed based on the normalized values of the logarithm of separation factors of the selected racemates in order to classify the CSPs in their ability to discriminate the enantiomers. Again, Ward's method of agglomeration was used and the Euclidean distance defined the distance between two clusters.

Two enantiomers were considered to be separated when the separation factor was strictly above 1, that is to say whenever it was possible to observe two peaks. From the initial solute set, only 85 racemates were used. They correspond to those whose separation factors could be calculated on all six columns. Indeed, we removed some problematic compounds, i.e. when degradation, poor peak shape or excessive retention caused uncertainty in identification of the enantiomers on any one of the column tested.

The hierarchical tree diagram (Fig. 9) represents how the algorithm defines the level of dissimilarity between the phases in terms of *enantioselectivity*. The columns can be divided into three groups. (i) Chiralcel OD, (ii) Lux Cellulose-1 (iii) CelluCoat, Chiralpak IB, Reprosil OM and RegisCell. The results suggest that Chiralcel OD and Lux Cellulose-1 both have unique ability for enantio-recognition. If we displace the position of the truncation towards a greater similarity value, the closest CSP to Chiralcel OD is Lux Cellulose-1.

Fig. 10 partially reflects the experimental findings. Fig. 10a compares the separation factors on Lux Cellulose-1 and Chiralcel OD. The large proportion of racemates located on the first bisector indicates similar separation behaviour, in accordance with the AHC.

If we now have a look on the plot comparing Reprosil OM and Chiralcel OD (Fig. 10b), still a larger number of racemates is plotted on the first bisector (indicating similar separation behaviour). However, Reprosil OM is located in another cluster with a relatively high level of dissimilarity compared to Chiralcel OD. This is again indicative of the limits of clustering analysis, because the similarity based on Fig. 10b seems rather high while Fig. 9 would yield a false conclusion of dissimilarity. We suppose that extreme values of separation factors have an excessive influence on the graph appearance. In Fig. 10a, the data points on the first bisector have larger values than those on this same line for Fig. 10b and may thus act as lever points. That can explain the position of Reprosil OM, in a different cluster from Chiralcel OD.

Fig. 10c, on the contrary, illustrates a more significant difference between Chiralcel OD and Chiralpak IB, with much less data points situated on the first bisector, and a greater success rate on Chiralcel OD than on Chiralpak IB with most data points being plotted below the first bisector.

Moreover, an essential point must be stressed: clusters of the present AHC (Fig. 9) are different from the previous one (Fig. 6). In

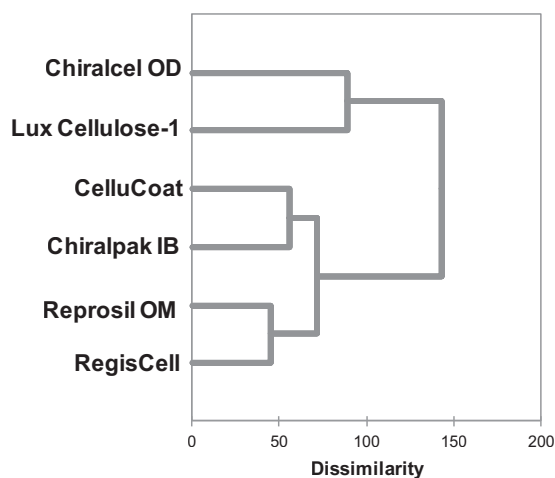


Fig. 9. Agglomerative hierarchical clustering based on the logarithm of 85 normalized separation factors of the set of chiral compounds. Dissimilarity was measured as the Euclidean distance between the columns.

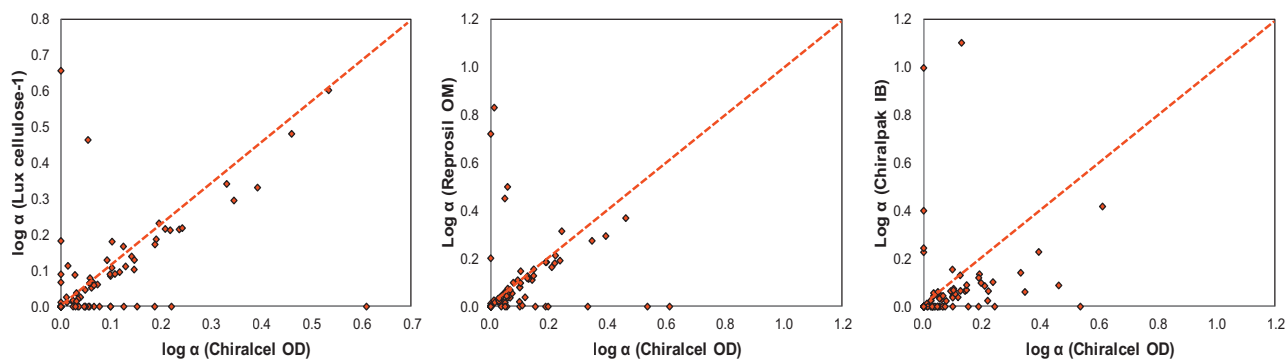


Fig. 10. Relationships between separation on three generic versions ($\log \alpha$ Lux Cellulose-1, $\log \alpha$ Reprosil OM, $\log \alpha$ Chiralpak IB) and separation on the reference column ($\log \alpha$ Chiralcel OD). The first bisector (interrupted red line) indicates identical separation factors on both columns. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the first AHC, Lux Cellulose-1, CelluCoat and Reprosil-OM showed similar retention behaviour to Chiralcel OD. In the present AHC, the level of dissimilarity between these columns is relatively high. This is an indication that non-enantioselective interactions contributing to retention and enantioselective interactions contributing to separation are different. We had already pointed out in previous works that interactions with minor contributions to total solute retention can still be essential to chiral recognition [15]. Therefore, it is necessary to distinguish the two to understand enantio-recognition mechanisms.

Again, while a global comparison of the similarity between the six phases is interesting, the interpretation of a dendrogram is limited as it does not inform on the underlying reasons for the clustering.

3.3.2. Based on discriminant analysis

We look for another method to determine which structural features enable the enantiomers to bind and be discriminated on one cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) CSP. In previous works, we have shown that discriminant analysis (DA) is a useful tool in this respect [15]. It is a multivariate statistical method which lies in the existence of predefined categories into which the “observations” may be classified. According to our problematic, the easiest strategy is to consider two categories: class 1 in which enantiomers were separated ($\alpha > 1$) and class 2 in which enantiomers are co-eluted (no measurable separation). The advantage of a two-class DA is that it will result in a single discriminant function named F1, thus all results can be projected on a single axis. The interpretation of DA results lies in barycentre plots and loading plots. The former representation displays the position of the centres of gravity for each class of enantiomers on an axis. The loading plot represents the contribution of each solute descriptor to enantioseparation. As the class 1 barycentre is placed on the left-hand side of the axis and class 2 barycentre is on the right-hand side in all six cases (figure not shown), descriptors located on the left-hand side of the axis indicate structural features that favour enantioseparation while

descriptors on the right-hand side indicate structural features that would favour co-elution of the enantiomers.

The quality of the obtained models can be assessed with different tools. Confusion matrix is one of them. It shows the repartition of the different molecules depending on the experimental observations (“separated” or “non-separated”, thus the *a priori* class) and the class to which the model predicts they belong. True positives and true negatives represent the correctly predicted molecules in classes 1 and 2 respectively (as shown in Table 2). The associated accuracy characterizes the model quality. However, it must be pointed out that accuracy is largely associated to the initial data set, thus to the choice of test solutes. In all cases, the proportion of true positives in class 1 (separated racemates) is high, comprised between 79% and 91%. On the contrary, true negatives in class 2 are always lower (comprised between 31% and 60%). As pointed out in previous works [15], reasons for the poor scores in true negatives were most probably due to the imbalance of the data set since experimentally non-separated enantiomers were always a minority: comprised between 29% and 50%. Thus the characteristic features of the non-separated solutes may not be assessed with sufficient precision. Extending the data set to solutes that are not separated may paradoxically be an advantage to better unravel the enantio-recognition process. A supporting observation for this explanation is that Chiralpak IB has the better score for true negatives (72%) while it also has the largest proportion of racemates in class 2 (50%).

The ROC (receiver operating characteristics) curve is another tool to assess the model quality (see Ref. [15] for details). The area under the curve (AUC) is a synthetic index calculated for ROC curves. Generally, a model is considered to be good when AUC is over 0.7. When the AUC is close to 1, the model is excellent. A value close to 0.5 indicates that the model is not better than a random assignment. Table 2 also provides the AUC values for all six columns.

AUC was comprised between 0.70 and 0.83, indicating that the prediction model was reasonably good to allow for interpretation of the loading plots.

Table 2

Statistical data, useful to get an insight of the quality of the models.

	Class 1 true positives	Separated racemates (<i>a priori</i> class 1)	Class 2 true negatives	Non-separated racemates (<i>a priori</i> class 2)	AUC
Chiralcel OD	89%	71%	47%	29%	0.81
Lux cellulose-1	91%	67%	45%	33%	0.80
Cellucoat	80%	54%	60%	46%	0.78
Chiralpak IB	79%	50%	72%	50%	0.82
Reprosil OM	90%	63%	32%	37%	0.70
RegisCell	82%	59%	57%	41%	0.83

AUC is the area under the ROC curve, see text for details.

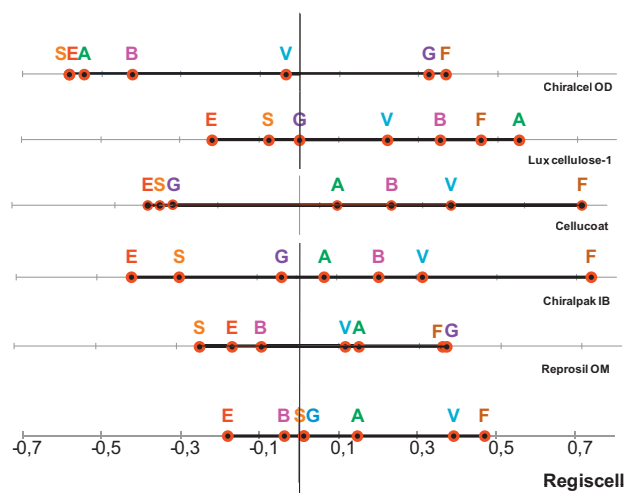


Fig. 11. Loading plots of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) representers the contribution of each structural feature to enantioseparation; favourable contributions point to the left-hand side; unfavourable contributions point to the right-hand side.

A detailed description of the original cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) DA model is available in our previous study [15]. Polar features of the solute (descriptors *E*, *S*, *A* and *B* pointing to the left side of the loading plot) promote enantioseparation and confirm the significant role of phenylcarbamate units as the main enantio-recognition sites. This involves hydrogen bonding (*A* and *B*), π – π interactions (*E*) and dipole–dipole interactions (*S*) between enantiomers and the chiral grooves of the CSP. It was often observed that small structural changes as presence or absence of polar groups have a strong impact on enantioseparation. This is in accordance with the large values observed for the loading of the *E*, *S*, *A* and *B* structural features indicating that small changes in polar interaction capabilities significantly affect enantioseparation.

The molecular volume (*V*), being close to the origin, is not significant to explain enantioseparation thus two racemates with different volumes but otherwise comparable features (in terms of their shape and interaction capabilities) would face comparable enantioseparation.

On the contrary, other structural aspects like flexibility and compactness (*F* and *G* located on the right side of the loading plot) of the solute are not favourable in the discrimination of enantiomers. This finding confirms that chiral recognition is also influenced by the higher order structure of the chiral sites in the CSP. Indeed, a

significant feature of chiral recognition is the fit of the analyte into the chiral cavity of the CSP.

In the present work, the focus is on the differences in the position of solute descriptors along the discriminant function *F1* between the six columns evaluated, which could influence the enantioseparation. Fig. 11 compares the loading plots of the six CSPs. At first sight, we observe that the descriptors' positions on generic CSPs are different from those on Chiralcel OD. In the generic columns, the polarizability (*E*) and the dipolar (*S*) characters are the main and essential features that promote enantioseparation. The acidic and basic characters (*A* and *B*) are either not significant (close to the centre of the loading plot) or not favourable to enantioseparation (on the right-hand side of the plot). Hence, enantiomers might establish less hydrogen bonding interactions through the contribution of carbamate moieties. We could suppose a limited access into the centre of the grooves that could result from a difference in the three-dimensional structure of the chiral sites in the generic CSPs in comparison to Chiralcel OD. Early works have reported the dramatic variations of chiral recognition ability produced by the preparation conditions (depositing method and solvating agent) [28]. Another explanation is that parasitic hydrogen bonding interactions as could occur with the silica surface or possible aminopropyl ligands might be somewhat deleterious to enantio-recognition.

Another significant difference is that of compactness of the molecule (*G*) and molecular volume (*V*). While globularity is not favourable to enantio-recognition on Chiralcel OD, it is not significant on all other phases apart from Reprosil OM. On the contrary, molecular volume was not significant on Chiralcel OD, and is not favourable to enantioseparation on most generic CSPs either. Again different three-dimensional structure of the polysaccharide may be responsible for these differences.

Using this approach, differences in the ability of the six CSPs to discriminate enantiomers are demonstrated. While on Chiralcel OD the carbamate moieties appear to be the main adsorbing site, it is not necessarily the case on the others: it seems that carbamate moieties are less available on generic CSPs. It is possible that the entrance to the chiral grooves is different from one column to another, or that the size of chiral cavities does not accommodate all solutes to allow for interaction with the carbamate functions. The less hydrogen bonding in the chiral process could explain the lower success rate observed with the generic CSPs comparing to Chiralcel OD.

The example Fig. 12 illustrates the usefulness of the previous findings. The studied analytes (1-phenylethanol and 1-(2-naphthyl)-ethanol) differ by the ability to establish π – π interactions, on both Chiralpak IB and Chiralcel OD. While a separation of

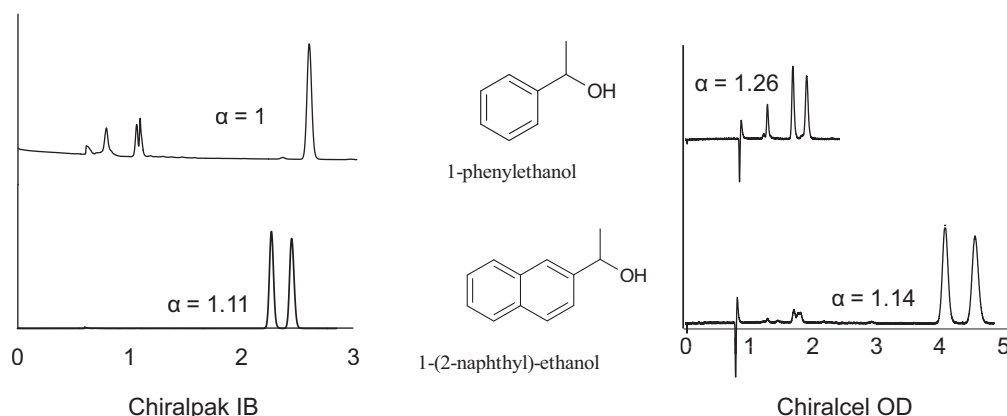


Fig. 12. Sample application to evidence the contribution of structural features on the separation of two pairs of enantiomers on two columns. 1-(2-Naphthyl)-ethanol, exhibiting larger *E* and *S* values (aromaticity) but comparable *A* and *B* values (hydrogen-bonding properties) compared to 1-phenylethanol.

the enantiomers is obtained for 1-phenylethanol on Chiralcel OD (α 1.26), they are coeluted on Chiralpak IB. In this case, Chiralcel OD certainly benefits from the added contribution of aromaticity and hydrogen bonding to achieve the separation. By increasing the aromaticity (*E*) of the analyte (phenyl ring replaced by naphthyl moiety), the probability of separation on Chiralpak IB is increased. Indeed, the two enantiomers of 1-(2-naphthyl)-ethanol are separated on the immobilized column.

4. Conclusion

We have carried out a thorough characterization of six columns based on the same chiral selector tris-(3,5-dimethylphenyl)carbamate. The solute–CSP interactions contributing to retention and separation factors involved in the enantioseparation display more or less significant differences among the six CSPs. None of the generic columns shows equal capability to bind and discriminate between enantiomers to the original Chiralcel OD. Based on our results, we suppose that the contribution of hydrogen bonding in each phase is one of the possible reasons for the observed differences.

As a method development is considered, a typical user could take into account the generic columns according to the loading capacity, the selectivity, the specificity and/or the success rate.

Acknowledgments

We are very grateful to the manufacturers who kindly provided the stationary phases for this study: Magali Dupin (Phenomenex), Jelena Kocergin (Regis Technologies), Bernt Larsson and Margaretha Svensson (Akzo Nobel), and Albin Maisch (Dr. Maisch). Finally, we express deep appreciation to Olle Gyllenhaal (Uppsala

University) for his useful comments that certainly contributed to improve the quality of this paper.

References

- [1] H.-J. Federsel, *Chirality* 15 (2003) S128.
- [2] E.R. Francotte, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 379.
- [3] M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814.
- [4] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia* 6 (1973) 277.
- [5] E. Francotte, R.M. Wolf, D. Lohmann, R. Mueller, *J. Chromatogr.* 347 (1985) 25.
- [6] T.D. Booth, I.W. Wainer, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 157.
- [7] T.E. Beesley, *LCGC North Am.* 28 (S4) (2010) 32.
- [8] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 336.
- [9] H. Nelander, S. Andersson, K. Öhlén, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9397.
- [10] M. Vitha, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 143.
- [11] K. Héberger, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 273.
- [12] C.R. Mitchell, N.J. Benz, S. Zhang, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 65.
- [13] A. Berthod, C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 61.
- [14] C. West, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2019.
- [15] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2033.
- [16] Z. Pirzada, M. Personick, M. Biba, X. Gong, L. Zhou, W. Schafer, C. Roussel, C.J. Welch, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1134.
- [17] A.A. Younes, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 414.
- [18] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, *Chromatographia* 70 (2009) 723.
- [19] Y. Okamoto, R. Aburatani, S.-I. Miura, K. Hatada, *J. Liq. Chromatogr.* 10 (1987) 1613.
- [20] C. Minguión, P. Franco, L. Oliveros, P. López, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 407.
- [21] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality* 15 (2003) 77.
- [22] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, T. Murakami, A. Ohnishi, H. Kurosawa, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 221.
- [23] J.Y. Jin, W. Lee, J.H. Park, J.J. Ryoo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 1.
- [24] T. Zhang, P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi, T. Murakami, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 178.
- [25] E. Lesellier, C. West, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 345.
- [26] C. West, E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 200.
- [27] C. West, S. Khater, E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 182.
- [28] E. Francotte, T. Zhang, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 257.

Les résultats de la caractérisation et la comparaison de PSC non halogénées et halogénées en chromatographie en phase supercritique sont rapportés dans les deux articles suivants :

Syame Khater, Yingru Zhang, Caroline West

Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography III.

Non-halogenated polysaccharide stationary phases

Journal of Chromatography A, 1363 (2014) 278-293

Syame Khater, Yingru Zhang, Caroline West

Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography IV.

Chlorinated polysaccharide stationary phases

Journal of Chromatography A, 1363 (2014) 274-310



Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography III. Non-halogenated polysaccharide stationary phases



Syame Khater^a, Yingru Zhang^b, Caroline West^{a,*}

^a Université d'Orléans, ICOA, CNRS UMR 7311, Pôle de Chimie, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

^b Bristol-Myers Squibb, PO Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08453-4000, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2014

Received in revised form 18 June 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 2 July 2014

Keywords:

Chiral recognition

Linear solvation energy relationship (LSER)

Polysaccharide-based chiral stationary phases

Quantitative structure–retention

relationships (QSRR)

Solvation parameter model

Supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

The majority of published enantiomeric separations by supercritical fluid chromatography (SFC) utilize chiral stationary phases (CSP) based on chemically derivatized amylose or cellulose, coated or immobilized on silica. There is a large diversity among these polysaccharide-type CSP enhancing the scope of chiral separation applications. But on the other hand, identifying the appropriate support for a given separation problem is rather difficult. Hence, this study aims to provide insights on the difference and similarity among the non-halogenated polysaccharide CSP in terms of retention and selectivity at a molecular level.

Firstly, the potential of the clones provided by different manufacturers is evaluated with carbon dioxide – methanol mobile phases. Then different aspects of the chiral recognition mechanism contributing to the separations on 16 different columns of five distinct chiral selectors will be explored based on a large amount of experimental data acquired with the help of modelling and chemometric techniques. We report the influence of the ligand bonded to the polysaccharide on the non-enantio-specific interactions between the solute and the CSP, comparing phenylcarbamate to 3,5-dimethylphenylcarbamate, and 4-methylphenylester to 3,5-dimethylphenylcarbamate. In addition, we evaluate the impact of the silica treatment on the quality of the separation. The phases are characterized in terms of their retention characteristics assessed by the solvation parameter model and separation capabilities assessed by discriminant analysis.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chiral chromatography is a favourite analytical and preparative tool to assess enantiopurity and to access enantiopure compounds in varied industries, particularly in the pharmaceutical community [1–3]. During early pharmaceutical development, a high value is placed on methods that can provide small quantities of individual enantiomers needed for bioactivity investigations quickly and with minimum labour and material costs. Among the chromatographic approaches, high-performance liquid chromatography (HPLC) and supercritical fluid chromatography (SFC) are dominating the scene and are often seen as complementary techniques. With short analysis time, high separation efficiency and low solvent consumption [4], the “green” SFC technology is more and more integrated into many laboratories.

Over the past few years, chiral SFC has been intensively developed with the advances in the instrumentation and stationary phase chemistries [5–7]. In our laboratory, we work on the rationalization of chiral separation processes in SFC in order to identify the appropriate parameters to meet specific chiral separation demands. The first parameter to optimize is the nature of the chiral stationary phase. The constant innovation in column technology reminds us that a universal CSP does not exist yet. The large number of CSP and the various chromatographic modes (normal-phase and reversed-phase liquid chromatography, polar organic and supercritical fluid chromatography) offer a broad spectrum of enantioselectivity [3,8–11]. Generic screening remains the most widely used approach to rapidly select the appropriate conditions providing a good starting point for further optimization.

Among the available CSP, the modified amylose and cellulose CSP, firstly developed by Okamoto and later commercialized by Daicel corporation, show a large application scope (aromatic alcohol, amides, β -blockers [12], carboxylic acids or amino acids [13] for instance) and are routinely used in preparative scale as

* Corresponding author. Tel.: +33 238494778; fax: +33 238417281.
E-mail address: caroline.west@univ-orleans.fr (C. West).

they have the additional advantage of high loadability. They were first evaluated in HPLC but their use in SFC also ensures broad enantioselectivity abilities [12,14,15]. Screening strategies were generally developed using the traditional so-called “Golden 4” (Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralcel OJ and Chiralpak AS). The amylose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD) and cellulose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralcel OD) have been the most widely studied derivatives as they have well-established efficient recognition abilities toward a wide range of racemates. The cellulose *tris*-(4-methylbenzoate) (Chiralcel OJ) and amylose *tris*-(S)- α -methylbenzylcarbamate] (Chiralpak AS) are less described in the literature and only few enantioseparation applications are reported [16–19]. Other less popular CSP are available as cellulose *tris*-(phenylcarbamate) (Chiralcel OC), cellulose triacetate (Chiralcel OA) or cellulose tribenzoate (Chiralcel OB) for instance. Besides, chlorinated phases are increasingly popular and will be the topic of a following paper.

Since these CSP are off-patent, a parallel market is now available with the introduction of a number of “clones”. Indeed, Kromasil phases (Akzo Nobel), Lux chiral line (Phenomenex), Regis Technologies columns and CSP from ES Industries, Dr Maisch or Orochem Technologies compete with Daicel columns and promise comparable performances. We recently published a comparison of six cellulose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) CSP in SFC, including Chiralcel OD, Kromasil Cellucoat, RegisCell, Lux Cellulose-1, Reprosil Chiral-OM and Chiralpak IB [20]. Manufacturers have tried to comply with various parameters in an attempt to obtain identical CSP. The silica support and its possible pre-treatment, polydispersion of the polysaccharide, coating process and coating solvent [21] could all impact the chiral recognition ability and alter enantioselective profiles of the CSP. In this context, AD-type (RegisPack, AmyCoat, Reprosil Chiral-AM) and OJ-type CSP (Lux Cellulose-3, Reprosil Chiral-JM) are also available and their potential will be evaluated here under SFC conditions.

In the present study, our goal is also to reveal how small differences in polysaccharide-type CSP structure can significantly impact enantioselectivity. Different aspects of the chiral recognition mechanism must be considered. Chiral recognition ability greatly depends on the number, position and nature of the substituents on the aromatic ligands bonded to the polysaccharide backbone. Okamoto et al. suggested that the introduction of substituents at 3- or 4-position tends to improve enantioseparation [22]. Moreover, replacing the carbamate moieties (as in Chiralcel OD) by ester functions (as in Chiralcel OJ) modifies the molecular environment and attributes specific retention behaviour to each phase.

Since 2004, the introduction of immobilized polysaccharide CSP on the market is a significant innovation in the field of chiral chromatography resolution to overcome the solvent restriction of the coated phases and enhance their solvent stability [23]. For instance, these phases can be used as routine tools in an open-access setting to monitor stereo-controlled reactions [24]. Their evaluation under SFC conditions is still in progress. However, it becomes a common knowledge that the immobilized and coated CSP of the identical polysaccharide derivative often yield different enantioselectivity under the same experimental conditions. We have previously compared Chiralpak IB (immobilized) to Chiralcel OD (coated with the same chiral selector), and suggested that there might be a difference in the size of chiral cavities, or a privileged access to unmodified hydroxyl groups of the glucose units, contributing to different hydrogen bonding [20]. In the present paper we will similarly try to identify if the immobilization method applied on Chiralpak IA affects its chiral recognition ability, compared to Chiralpak AD (coated version with the same chiral selector).

Finally, on amylose-type CSP, attempts were made to find out the influence of the silica matrix on the nature of the non-specific

interactions, comparing an AD-type phase (Reprosil Chiral-AM) that is based on silica modified with amino-propyl ligands prior to polysaccharide coating, and its homologous prototype that is based on unmodified silica particles.

This project is based on the rationalization of large amounts of experimental data with the help of modelling and chemometric techniques. In particular, quantitative structure–retention relationships (QSRRs), agglomerative hierarchical clustering (AHC) and discriminant analysis (DA) are applied to unravel the enantio-recognition mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Columns

In this paper, sixteen commercialized and one non-commercial CSP were compared. The chemical structures and dimensions are gathered in Table 1. Only one column was a non-commercial CSP of amylose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on non-bonded silica gel (Reprosil Chiral AM2) and was kindly provided by Dr. Maisch to compare with the same polymer coated on amino-propyl-bonded silica.

Because the columns do not all have the same dimensions, only retention (k) and separation factors (α) will be considered. Column efficiency and resolution will not be compared due to differences among the column lengths and particle sizes. The internal pressure was not exactly constant for all columns, as outlet pressure was maintained constant for all columns ($P_{\text{outlet}} = 150$ bar) but inlet pressure depends on column length and particle size. Density variations from column to column should be limited under the operating conditions of our study (low temperature and high back-pressure) as the fluid compressibility is lessened. Recently, Tarafder et al. discussed the effect of pressure and density in the sub- and super-critical area. The authors recommended operating under conditions of low compressibility of CO₂ to avoid density variation along the column and poor column efficiency [25]. Besides, it was shown that pressure does not affect enantioselectivity in dense fluid conditions such as the ones we are using here [26].

2.2. Chemicals

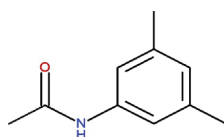
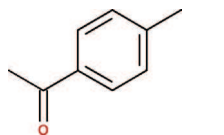
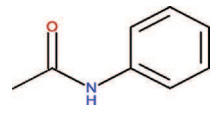
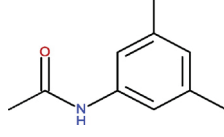
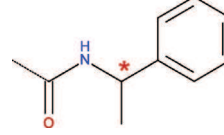
The solvent used was HPLC-grade methanol (MeOH) provided by VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Carbon dioxide of industrial grade 99.5% was provided by Messer (Puteaux, France). Solutions of all test compounds were prepared in MeOH with concentrations in the range 100–1000 ppm. Our set of test compounds comprised 230 achiral molecules and 130 racemates obtained from a range of suppliers. The majority of the 130 racemates were from commercial sources while a small proportion of them were in-house synthesized products whose structures are confidential. The complete lists of compounds can be found in our previous works [27,28].

2.3. Chromatographic system

The Waters Acquity UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²) was equipped with a binary solvent delivery pump compatible with mobile phase flow rates up to 4 mL/min and pressures up to 414 bar, an autosampler that included partial loop volume injection system, a backpressure regulator, two column ovens (one compatible with 150 mm length columns and the other one compatible with 250 mm length columns) and a PDA detector. The Empower software was used for system control and data acquisition.

The mobile phase used in this study is CO₂–MeOH 90:10 (v/v). Flow rate was 3 mL min^{−1}. Temperature was set at 25 °C and the outlet pressure was maintained at 150 bar for all columns. While

Table 1
17 columns characterized and compared in this study.

Designation	Full name	Manufacturer	Polysaccharide	Ligand	Dimensions (mm)	Particle size (μm)
OD	Chiralcel OD-H	Daicel	Coated		150 × 4.6	5
LC1	Lux Cellulose-1	Phenomenex	Coated		250 × 4.6	5
RC	RegisCell	Regis Tech.	Coated		150 × 4.6	5
CC	Cellucoat	Akzo Nobel	Coated		150 × 4.6	5
OM	Reprosil Chiral OM	Dr. Maisch	Coated		250 × 4.6	5
IB	Chiralpak IB	Daicel	Immobilized		150 × 4.6	3
OJ	Chiralcel OJ-H	Daicel	Coated		150 × 4.6	5
LC3	Lux Cellulose-3	Phenomenex	Coated		250 × 4.6	5
JM	Reprosil Chiral JM	Dr. Maisch	Coated		250 × 4.6	5
CM	Reprosil Chiral CM	Dr. Maisch	Coated		250 × 4.6	5
AD	Chiralpak AD-H	Daicel	Coated		150 × 4.6	5
RP	RegisPack	Regis Tech.	Coated		150 × 4.6	5
AC	AmyCoat	Akzo Nobel	Coated		150 × 4.6	5
AM	Reprosil Chiral AM	Dr. Maisch	Coated		250 × 4.6	5
AM2	Reprosil Chiral AM2	Dr. Maisch	Coated (non-bonded silica)		250 × 4.6	5
IA	Chiralpak IA	Daicel	Immobilized		150 × 4.6	3
AS	Chiralpak AS-H	Daicel	Coated		150 × 4.6	5

additives are commonly used to enhance peak shape (*i.e.* peak tailing and broadening) of ionizable compounds, we decided not to use any of them in the mobile phase for this particular study. Additives may adsorb onto the CSP and complicate the understanding of chiral mechanism. Our present goal is to improve understanding of chiral separations, not to optimize them, so additives effect shall be the topic of further studies.

Injection volume was 1 μL for all compounds. Retention factors (*k*) were calculated based on the retention time *t_R*, determined using the peak maximum (even when tailing did occur, for some of the most basic compounds) and on the hold-up time *t₀* measured on the first negative peak due to the unretained sample solvent.

2.4. Data analysis

All multivariate data analyses were performed using XLStat 7.5 software (Addinsoft, New York, NY). The quality of the QSRR fits was estimated using the overall correlation coefficient (*r*), adjusted determination coefficient (*R*_{adj}²), standard error in the estimate (*SE*) and Fischer *F* statistic. The statistical significance of individual coefficients was evaluated using the *t*-ratio, which is defined as the ratio of the regression coefficient to its standard error. The quality of Discriminant Analysis (DA) was estimated based on ROC (receiver operating characteristics) curves and confusion matrices.

Abraham solute descriptors (*E*, *S*, *A*, *B* and *V*) were extracted from an in-house database established from all available literature on the solvation parameter model, or, for those compounds that cannot be found in the literature, calculated with the Absolv Webboxes program, based on ADME Boxes version 3.5 (Pharma Algorithms, ACD Labs, Toronto, Canada).

Additional descriptors (*F* and *G*) were computed in-house with MOE 2009.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Canada), and QikProp 2009/08/20 (Schrödinger) [28]. A stochastic conformational analysis was performed with MOE 2009.10 with the

following parameters: maximum number of iterations 10 000; RMS gradient 0.005; maximum number of rejected structures 50; MM iteration limit 500; RMSD limit 0.25; strain cut off 1; conformation limit 1 (so as to retrieve only the conformation with the minimum energy).

The complete table of descriptors for achiral and chiral compounds can be found in previous papers [27,28].

3. Results and discussion

3.1. General overview

3.1.1. Based on success rates

More and more polysaccharide-based stationary phases are introduced in the market leading to performances that are either equivalent or complementary to the ones existing. Their evaluation is required to facilitate the selection of the most promising chiral stationary phases (CSP) for a high success rate chiral screening or for a given separation. In this paper, sixteen commercial CSP were evaluated (Table 1).

First of all, the sixteen CSP were classified in order to evaluate their relative performance towards a wide range of compounds. The bar charts (Fig. 1) represent two different rankings:

- Fig. 1a compares success rates based on the ratio of observed enantioseparation to number of compounds successfully eluted in the present conditions (see above experimental conditions). Any separation factor strictly superior to 1 was considered a “success”, whatever the resolution, because we wanted to evidence enantioselective capabilities, in full understanding that a low resolution could be further optimized by changing the operating conditions. The ranking is clearly unrelated to the chemistry of the CSP, as stationary phases with a comparable polysaccharide and ligand are scattered in the figure. This

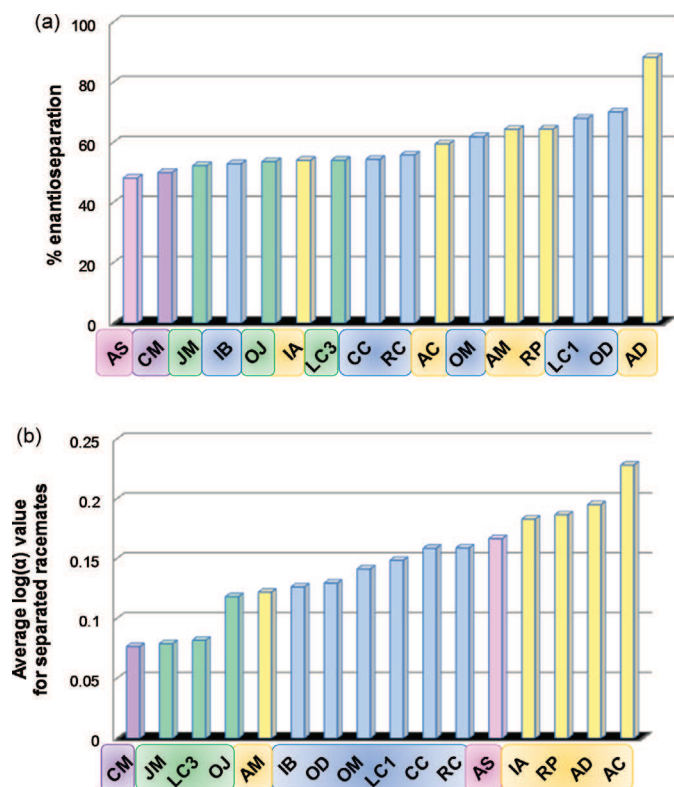


Fig. 1. Overall performance observed on the 16 commercial columns (see Table 1 for identification). (a) Success rate measured on each chiral stationary phase. (b) Average separation factors for separated racemates. Font colours are used to evidence columns with similar stationary phase chemistry. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

indicates that column performance varies significantly among the different manufacturers. For example, the resolutions of some closely eluting enantiomers that are achievable on AD are clearly lost or altered on RP, AM and AC that use the same amylose derivative.

- (ii) Fig. 1b presents a different ranking based on the average separation factors observed for the “successful” cases defined above. Thus the classification emphasizes the large differences in column enantio-selectivity for the test compounds: the classification here is rather based on strong enantioseparation capabilities, even if they apply to a small proportion of compounds. Contrary to the previous figure, the CSP are clustered according to stationary phase chemistry. It clearly indicates that the CSP chemistry plays a major role in chiral resolution; a particular type of CSP can afford large enantio-resolutions where others provide smaller average enantio-resolutions. It appears that amylose phases have larger average separation factors than cellulose phases (with the sole exception of the AM phase).

Combining the two ranking results, we have a more complete view of column performance: for instance, the 4-methylphenylester ligands (Chiralcel OJ, Reprosil-JM and Lux Cellulose-3) all have a relatively low ratio of successful enantioseparation and also a low average separation factor, while the (S)- α -methylbenzylcarbamate ligands (Chiralpak AS) that provided the smallest proportion of successful separations have a high average separation factor. In other words, the Chiralpak AS column likely offers some “niche” applications where its performance stands out.

Chiralpak AD is the most universal phase with the highest success rate (almost 90% for the selected set) and some of the largest

average separation factors. Then the Chiralpak AD clones (Reprosil-AM, AmyCoat and RegisPack) and the OD-type phases show the best success rate. The Chiralpak AD clones Reprosil-AM and RegisPack would be reasonable alternatives to Chiralpak AD as they provide an overall success rate around 60%, with an overlapping of more than 60% (proportion of racemates in the total set that are separated on both phases) with Chiralpak AD. In the literature, RegisPack is shown as an efficient column in combination with other Regis chiral phases (RegisCell, RegisPack CLA-1 and Whelk O1) for a wide range of racemates [29]. AD-type phases, albeit different for some low resolving enantiomers, all present the advantage to offer the largest separation factors for many racemates which is relevant at the preparative scale (Fig. 1b).

The phenylester phases are all much alike, with Chiralcel OJ providing the largest average separation factors. However, Lux Cellulose-3 has some specificity as there are 7% of compounds resolved only on this CSP. In their study, Hamman et al. reported that Lux Cellulose-3 outperformed the Chiralcel OJ phase [8].

The Reprosil Chiral columns individually provide success rates inferior to 65%. Reprosil-AM, Reprosil-OM and Reprosil-JM are successful and complementary in achieving more than 90% separations of the solute set, but for the selected set of compounds, Reprosil-CM did not provide any enantioseparation when Reprosil-AM, Reprosil-OM and Reprosil-JM failed. Reprosil-OM and Reprosil-JM achieve very reasonable performance compared to their parent phases Chiralcel OD and Chiralcel OJ.

The superior performance of the traditional “Golden 4” (only 1% of the selected set not resolved) mainly relies on Chiralpak AD that is clearly dominating all others.

3.1.2. Based on clustering

Two classifications based on agglomerative hierarchical clustering (AHC) were achieved to quickly gather the CSP depending on their ability to retain or discriminate the enantiomers (Fig. 2). Ward’s method was used to cluster the normalized data, and the Euclidean distance defined the distance between two clusters. The non-commercial column Reprosil Chiral-AM2 was also included in this comparison to assess the effect of the base silica modification.

The first AHC (Fig. 2a) is based on the logarithms of retention factors of the *achiral test compounds*. Only those compounds that could be successfully eluted on all columns were retained in this calculation, thus 170 compounds (out of the initial 230) were used. The data were normalized to ensure that any difference in phase ratio issuing from different packing procedures would not affect the result. Thus the observed clustering is rather resulting from comparable elution order regardless of the absolute retention on CSP.

Firstly, it appears that the CSP are clearly clustered according to the stationary phase polysaccharide and ligands, as the OJ, OD and AD-type phases are grouped together respectively. The immobilized phases Chiralpak IA and Chiralpak IB are two exceptions as they are closer to each other than they are to their parent family of coated phases (respectively AD- and OD-type phases). It suggests that the immobilization process is causing a substantial change in the possible interactions contributing to retention.

Chiralpak AS and Reprosil-CM phases exhibit specific and unique retention behaviour among all the columns but their closer counterparts are Chiralpak IA and Chiralpak IB.

The OJ-type phases (Chiralcel OJ, Reprosil-JM and Lux Cellulose-3) are clearly the most different from all other phases, which is not surprising judging by the fact that they have an ester ligand, while all others have carbamate ligands. It is clear that the nature of the side chain has a direct and significant impact on the possible interactions causing retention.

The second AHC (Fig. 2b) is based on the logarithms of separation factors ($\log \alpha$) of the *chiral test compounds*. Again we wished

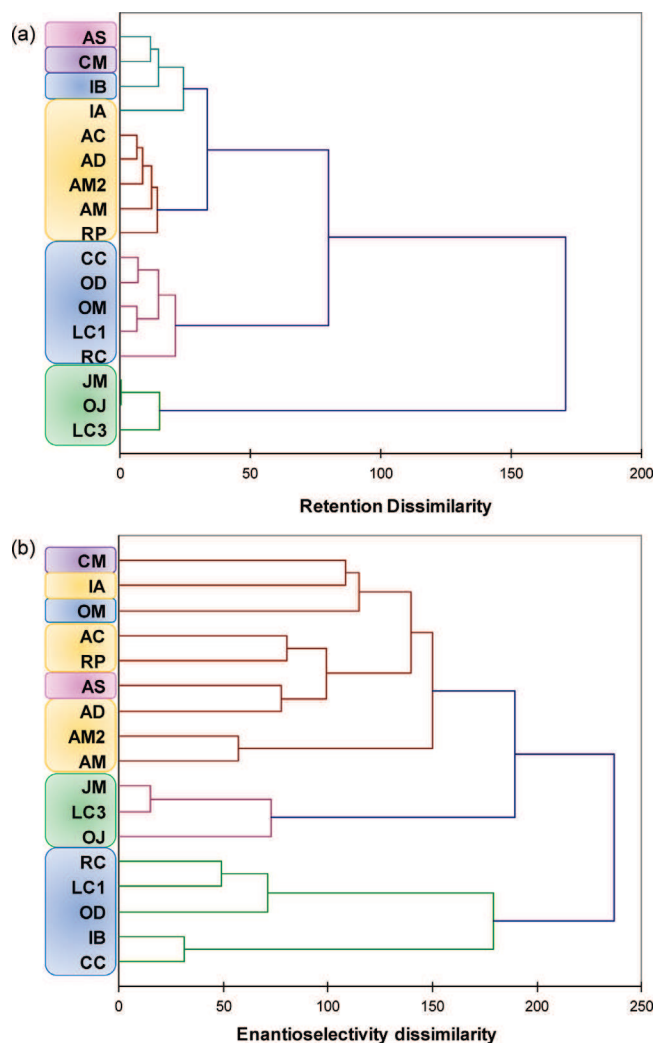


Fig. 2. Agglomerative hierarchical clustering based on (a) the logarithm of normalized retention factors ($\log k$) of 170 achiral compounds and (b) the normalized logarithm of separation factors ($\log \alpha$) of 124 racemates. Dissimilarity was measured as the Euclidean distance between the columns. The columns are identified in Table 1 and coloured according to stationary phase ligand. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

to retain only those compounds that could be successfully eluted on all columns. However, this would reduce the number of data to a great extent as some compounds were never observed on some columns, and they are not necessarily the same between different columns. As a result, we decided to fill in the gaps of the data table by assuming zero values for the unknowns. Finally, 124 compounds (out of the initial 130) were used for the calculation. The data were again normalized, thus two columns should be grouped in the same cluster depending on their ability to discriminate (or not) the same racemates, rather than to provide identical separation factors.

The separation behaviour appears to be readily affected by the nature of the polysaccharide backbone as all cellulose phases (OJ-type on the one hand and OD-type on the other hand) are grouped at the bottom of the classification, while amylose phases (AD-type and Chiralpak AS) are grouped at the top. Only Reprosil-CM and Reprosil-OM surprisingly do not cluster with the cellulose phases. It is interesting to note that, in this figure, the immobilized phases Chiralpak IA and Chiralpak IB are grouped with their parent coated phases (respectively Chiralpak AD and Chiralcel OD) in terms of enantioselectivity, while they were somewhat dissimilar for retention properties. The influence of the backbone on modulating the

interactions has been already proven with the help of IR spectra [30].

The AHC results of the two classifications suggest that the manufacturers of the clones are doing a good job in mimicking the retentability of the parent columns for any given chemical, a column property that is likely non-enantiospecific. As a result, all clones are clustered according to the CSP structure (polysaccharide and ligand) in terms of retention factor based on the achiral compounds tested. However, with respect to enantio-separation, many of the clones do not exhibit the same behaviour as their parent, particularly in discriminating enantiomers with low enantioselectivity. Thus, some clones are no longer clustered according to the CSP structure in terms of enantio-separation factor.

This general overview directs the study investigating different aspects of the chiral recognition mechanism. On cellulose-type CSP, the influence of the substitution of the side chain phenyl groups is firstly studied with the comparison of phenyl and 3,5-dimethylphenyl ligands (Reprosil-CM vs. Reprosil-OM), followed by the nature of the side chain with the comparison of ester and carbamate ligands (Chiralcel OJ vs. Chiralcel OD). On amylose-type CSP, comparison of generic AD-type columns and comparison between the ligands of Chiralpak AD and Chiralpak AS phases will be described. Finally, attempts have been made to find out the influence of the silica support on the nature of the non-specific interactions (Reprosil-AM vs. Reprosil-AM2).

3.2. Chemometric strategies employed to describe retention and separation mechanisms

3.2.1. Retention properties characterized with quantitative structure–retention relationships

In our previous works, linear solvation energy relationships (LSER) based on a modified version of the solvation parameter model have been used to describe the intermolecular interactions and steric features [27,28] using the following Eq. (1):

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG \quad (1)$$

In this equation, capital letters represent the solute descriptors, related to particular structural features, while lower case letters represent the system constants, related to the complementary effect of the phases on these interactions. c is the model intercept term and is dominated by the phase ratio. E is the excess molar refraction (calculated from the refractive index of the molecule) and models polarizability contributions from n and π electrons; S is the solute dipolarity/polarizability; A and B are the solute overall hydrogen-bond acidity and basicity; V is the McGowan characteristic volume in units of $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}/100$; F is the flexibility of the molecule, calculated as the fraction of rotatable bonds; G is the globularity, qualifying the compactness of the molecule. We previously reported the introduction of the latter two descriptors (F and G) in addition to Abraham descriptors (E , S , A , B and V) to identify the spatial constraints that permit the access of the enantiomers toward the active binding sites [27,28]. Flexibility and Globularity were identified among others possible descriptors as two important properties for enantioselective chromatography. Flexibility is important for chiral resolution because flexible molecules have more conformers, thus more ways for intermolecular interactions, which is generally detrimental to enantioresolution. Globularity, or sphericity, can be related to steric impedance to insertion into the stationary phase but also to the possibility for a small molecule to better fit on the walls of a spherical cavity thus establish several interactions at a time. Both flexibility and globularity notions are totally absent from Abraham descriptors.

The system constants (e , s , a , b , v , f , g), obtained through a multi-linear regression of the retention data for a certain number of solutes with known descriptors, reflect the magnitude of

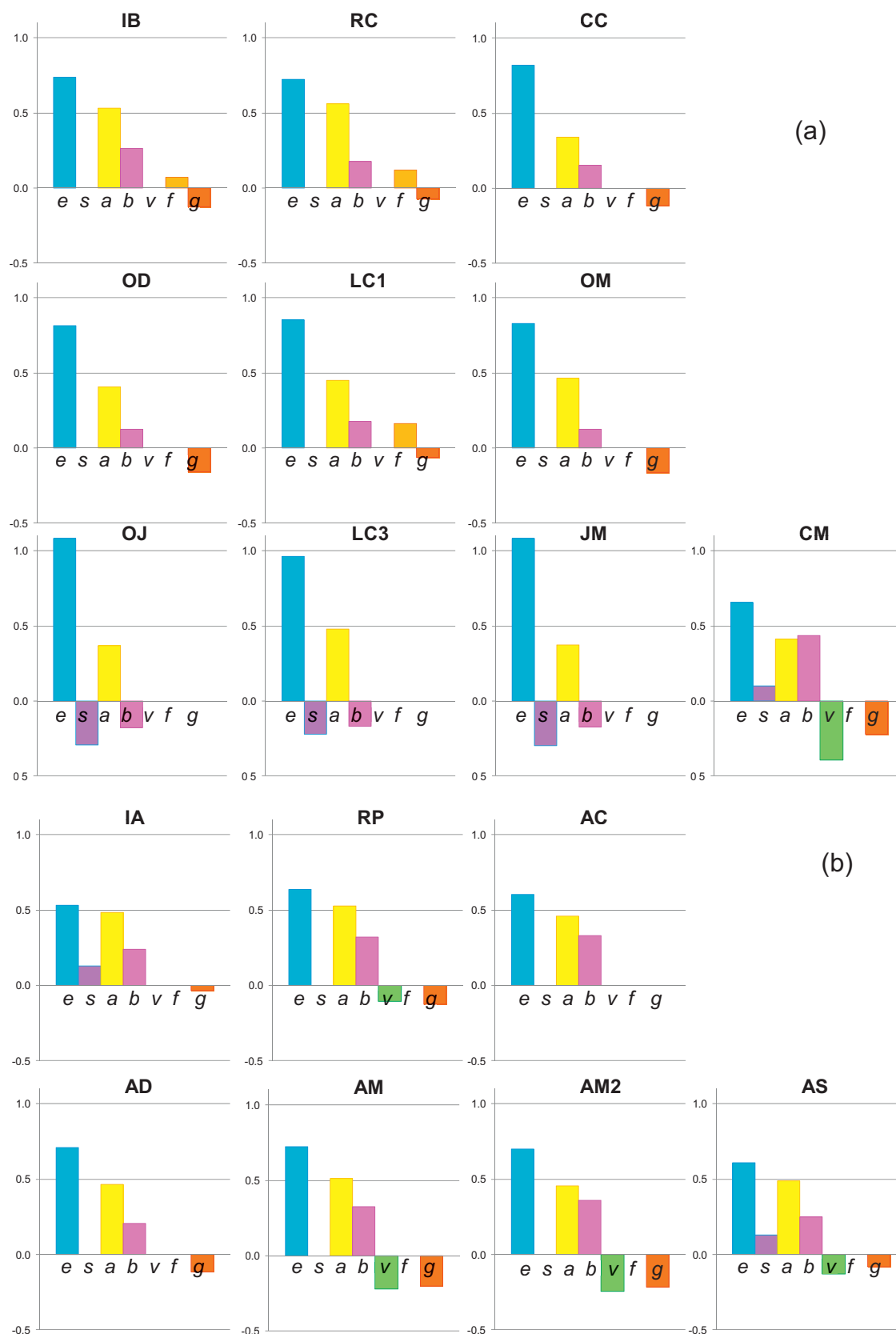


Fig. 3. The beta coefficients (*e*, *s*, *a*, *b*, *v*, *f* and *g*) issued from the multiple linear regression analysis on the 17 columns in Table 1. Each bar represents the contribution of a given interaction to retention (see text for details). (a) Cellulose CSP (b) amylose CSP.

Table 2Description of the terms in the modified LSER, Eq. (1): $\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG$.

Analyte descriptor	Significance	Corresponding coefficient	Possible interactions or effects described
E	Excess molar refraction, reflects polarizability contributions from n and π electrons	c e	model intercept, related to phase ratio Van der Waals interactions of London and Debye type (dispersive and dipole - induced dipole); π - π interactions
S	Polarity, polarizability	s	Van der Waals interactions of Debye and Keesom type (dipole-induced dipole and dipole-dipole)
A	Overall hydrogen donor capacity	a	Hydrogen bonding with acidic analytes
B	Overall hydrogen acceptor capacity	b	Hydrogen bonding with basic analytes
V	McGowan molecular volume	v	Van der Waals interactions of London type (dispersive); cavity effect or hydrophobic effect; steric resistance to insertion in chiral cavities
F	Flexibility (fraction of rotatable bonds)	f	Flexible adaptation between analyte and stationary phase
G	Globularity, sphericity or compactness	g	Steric resistance to insertion in chiral cavities

difference for that particular property between the mobile and stationary phases. Thus, if a particular coefficient is numerically large, then any solute having the complementary property will interact very strongly with either the mobile phase (if the coefficient is negative) or the stationary phase (if the coefficient is positive). The descriptors and coefficients of Eq. (1) are summarized and further described in Table 2.

Thus retention properties were evaluated with Eq. (1) for all columns. All results for the 17 columns in Table 1 are presented in Table 3 (the model system constants) and Fig. 3 (the beta coefficients to compare the relative contributions of each term to the model). A general overview of Fig. 3 indicates that the main interactions contributing to retention on all columns are π - π interactions (e term) followed by hydrogen-bonding with proton donors (a term). These features are naturally associated to interactions with the aromatic ring and C=O groups of the carbamate and ester functions of the ligands, that are present in all CSP investigated here. Other terms are more or less significant depending on the CSP and will be further discussed in the detailed description of models (*vide infra*).

3.2.2. Separation properties characterized with discriminant analysis

We have described in previous works that the above descriptors can also be used to describe enantioseparation processes with the help of discriminant analysis (DA). Firstly, the racemates can be divided into two classes for each CSP: one class is defined as “separated” ($\alpha > 1$) while the other one is described as “not separated” ($\alpha = 1$). We have shown before [15] that these two classes can be used in discriminant analysis (DA) to unravel the structural features that are common to successfully separated racemates and the structural features that are common to unresolved racemates. However, we had also pointed out at the time that the statistics associated to these calculations were not very high (with percentages of well-classified racemates being a little above random guess), because the class of separated racemates is not homogeneous. Indeed, the reasons for the racemates to be separated are not the same to all. We had then shown that the separated racemates could be further divided into two classes, based on the comparison of their retention to the retention that could be predicted based on Eq. (1).

We now proceed to divide all racemates analysed into four classes, defined according to Fig. 4:

- Class 1 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).
- Class 2 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted after their predicted retention, based on Eq. (1).
- Class 3 comprises racemates that were “not separated” ($\alpha = 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).

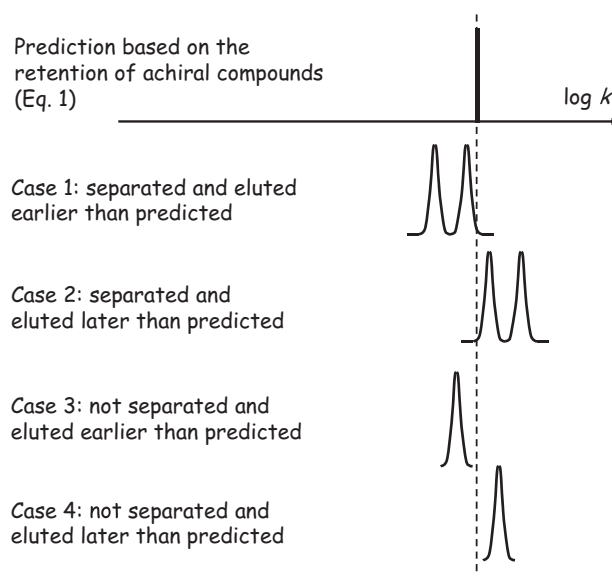


Fig. 4. Strategy employed to define classes among the racemates analysed on each CSP.

- Class 4 comprises racemates that were “not separated” ($\alpha = 1$) but eluted after their predicted retention, based on Eq. (1).

Then four different 2-class DA can be computed, which are much easier to interpret than 4-class DA:

- Class 1 vs. class 2 and class 3 vs. class 4 indicate the features that are responsible for a compound to elute earlier or later than predicted thus may indicate the reasons for heterogeneous behaviours.
- Class 1 vs. class 3 and class 2 vs. class 4 indicate the features that are common to successfully resolved racemates among early eluting or lately eluting compounds.

For this strategy to be successful, it is necessary that the number of compounds in each class remains large enough to be able to compute meaningful statistics. Our initial set of racemates comprises 130 racemates. On one CSP, it is frequent that this set is reduced down to 100 racemates because some of them will never elute in the selected screening conditions, or because peak shapes are so poor that it is difficult to decide if the separation was successful and how successful. Then assuming a success rate of about 60%, the 100 racemates can be grouped into 60 separated racemates and 40 non-separated racemates, which further group into two sub-groups. For some columns, class 4 did not comprise a sufficient number of racemates to draw meaningful conclusions. For instance, this was the

Table 3

The system constants obtained from the LSER analysis (Eq. (1)) for the CSP in Table 1.

Column	System constants								Statistics			
	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>ν</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>n</i>	R^2_{adj}	<i>SE</i>	<i>F</i>
OD	−0.54 <i>0.05</i>	0.69 <i>0.02</i>		0.54 <i>0.03</i>	0.18 <i>0.04</i>			−0.18 <i>0.03</i>	200	0.88	0.14	372
LC1	−0.88 <i>0.04</i>	0.70 <i>0.02</i>		0.64 <i>0.04</i>	0.28 <i>0.05</i>		0.05 <i>0.01</i>	−0.04 <i>0.02</i>	191	0.88	0.15	291
RC	−1.21 <i>0.04</i>	0.71 <i>0.03</i>		0.82 <i>0.04</i>	0.27 <i>0.05</i>		0.04 <i>0.01</i>	−0.05 <i>0.02</i>	172	0.86	0.17	216
CC	−0.86 <i>0.04</i>	0.69 <i>0.03</i>		0.49 <i>0.04</i>	0.23 <i>0.05</i>			−0.08 <i>0.02</i>	211	0.83	0.20	253
OM	−0.63 <i>0.05</i>	0.75 <i>0.02</i>		0.62 <i>0.03</i>	0.19 <i>0.04</i>			−0.21 <i>0.03</i>	173	0.91	0.14	430
IB	−1.05 <i>0.04</i>	0.64 <i>0.02</i>		0.75 <i>0.03</i>	0.43 <i>0.04</i>		0.02 <i>0.01</i>	−0.09 <i>0.02</i>	186	0.91	0.14	373
OJ	−0.77 <i>0.04</i>	1.11 <i>0.04</i>	−0.31 <i>0.06</i>	0.50 <i>0.04</i>	−0.24 <i>0.06</i>				171	0.86	0.17	266
LC3	−0.92 <i>0.05</i>	1.08 <i>0.05</i>	−0.25 <i>0.07</i>	0.68 <i>0.05</i>	−0.24 <i>0.07</i>				177	0.81	0.21	185
JM	−0.75 <i>0.04</i>	1.09 <i>0.04</i>	−0.31 <i>0.06</i>	0.49 <i>0.04</i>	−0.23 <i>0.06</i>				171	0.86	0.17	258
CM	−0.17 <i>0.22</i>	0.79 <i>0.05</i>	0.14 <i>0.06</i>	0.76 <i>0.05</i>	0.80 <i>0.08</i>	−0.55 <i>0.08</i>		−0.40 <i>0.09</i>	180	0.90	0.18	276
AD	−0.76 <i>0.07</i>	0.73 <i>0.03</i>		0.72 <i>0.05</i>	0.34 <i>0.05</i>			−0.16 <i>0.04</i>	208	0.84	0.20	279
RP	−0.75 <i>0.14</i>	0.66 <i>0.03</i>		0.74 <i>0.04</i>	0.44 <i>0.05</i>	−0.11 <i>0.05</i>		−0.18 <i>0.06</i>	180	0.87	0.17	243
AC	−1.05 <i>0.04</i>	0.64 <i>0.03</i>		0.65 <i>0.04</i>	0.49 <i>0.05</i>				182	0.85	0.18	342
AM	−0.35 <i>0.22</i>	0.78 <i>0.03</i>		0.85 <i>0.05</i>	0.55 <i>0.06</i>	−0.28 <i>0.08</i>		−0.32 <i>0.09</i>	168	0.88	0.18	246
AM2	−0.26 <i>0.23</i>	0.76 <i>0.04</i>		0.70 <i>0.05</i>	0.54 <i>0.06</i>	−0.30 <i>0.09</i>		−0.33 <i>0.10</i>	178	0.85	0.19	198
IA	−0.89 <i>0.08</i>	0.50 <i>0.04</i>	0.15 <i>0.06</i>	0.65 <i>0.05</i>	0.33 <i>0.06</i>			−0.05 <i>0.04</i>	180	0.84	0.18	182
AS	−0.72 <i>0.12</i>	0.53 <i>0.03</i>	0.13 <i>0.04</i>	0.64 <i>0.03</i>	0.33 <i>0.05</i>	−0.12 <i>0.04</i>		−0.11 <i>0.05</i>	171	0.91	0.13	275

n is the number of solutes considered in the regression. R^2_{adj} is the adjusted correlation coefficient.*SE* is the standard error in the estimate, *F* is Fischer's statistic.

Numbers in italics indicate error bars.

case with the Chiralpak AD column that has a very high success rate, which is a reason why we had not favoured this strategy previously. In such cases, the advantage of a very large initial selection of compounds is clear.

The interpretation of DA results usually lies in barycentre plots (position of the centres of gravity for each class of enantiomers on an axis) and loading plots (contribution of each solute descriptor to enantioseparation). Bar chart is a pedagogic and better way of demonstrating our results. To compare less and more retained racemates (classes 1/2 and 3/4 in Fig. 5), the descriptor's bar that are pointed on the left-hand side (negative values) indicate structural features that are common to less retained racemates while those pointed on the right-hand side (positive values) indicate structural features that are common to more retained racemates. To compare separated and non separated racemates (classes 1/3 and 2/4 in Fig. 6) the descriptor's bar that are pointed on the left-hand side (negative values) indicate structural features that favour co-elution of the enantiomers while those pointed on the right-hand side (positive values) indicate structural features that would favour enantioseparation.

Selected results that are representative for the 16 commercial columns are presented in Figs. 5 and 6.

First of all, it is clear from Fig. 5 that early eluting and lately eluting compounds all share a common pattern: lately eluting racemates, separated or not, all seem to be small and spherical molecules as large molecules preferably elute early (the *V* descriptor is pointing to the left) and globular molecules preferably are more retained (the *G* descriptor is pointing to the right). It is

also surprising that the other structural features responsible for interaction capability (polarity, polarizability, hydrogen bonding capacity) are all pointing to the group of early eluting racemates. This leads the following interpretation: early eluting racemates are rather large molecules that cannot enter certain small cavities in the stationary phase, while lately eluting racemates are smaller thus encounter less steric resistance to insertion in the said cavities. Besides, lately eluting racemates are rather spherical, possibly allowing them to better fit on the walls of the cavities than flat or rod-like molecules (small *G* values) could do.

Secondly, it can be observed from Fig. 6 that all non-separated racemates have one feature in common: their high flexibility (the *F* descriptor is pointing to the left on all figures). Indeed we had pointed out in previous works that flexibility generally appears to be the least helpful feature for enantio-recognition because flexible molecules have diverse ways to interact with the CSP, which somewhat dilutes discrimination between enantiomers.

Other features appear to differ between 1/3 and 2/4 discriminant analysis, further supporting the idea that the reasons why some racemates are separated or not separated are not the same to all molecules.

As we chose to present a selection of discriminant analysis, we must point out that cellulose phases are rather congruous with the OD-type phases and OJ-type phases showing very consistent patterns. Amylose phases form a rather heterogeneous group in terms of enantio-selectivity, as already pointed out with the cluster analysis (Fig. 2) above. Even if they are made with the same chiral selector

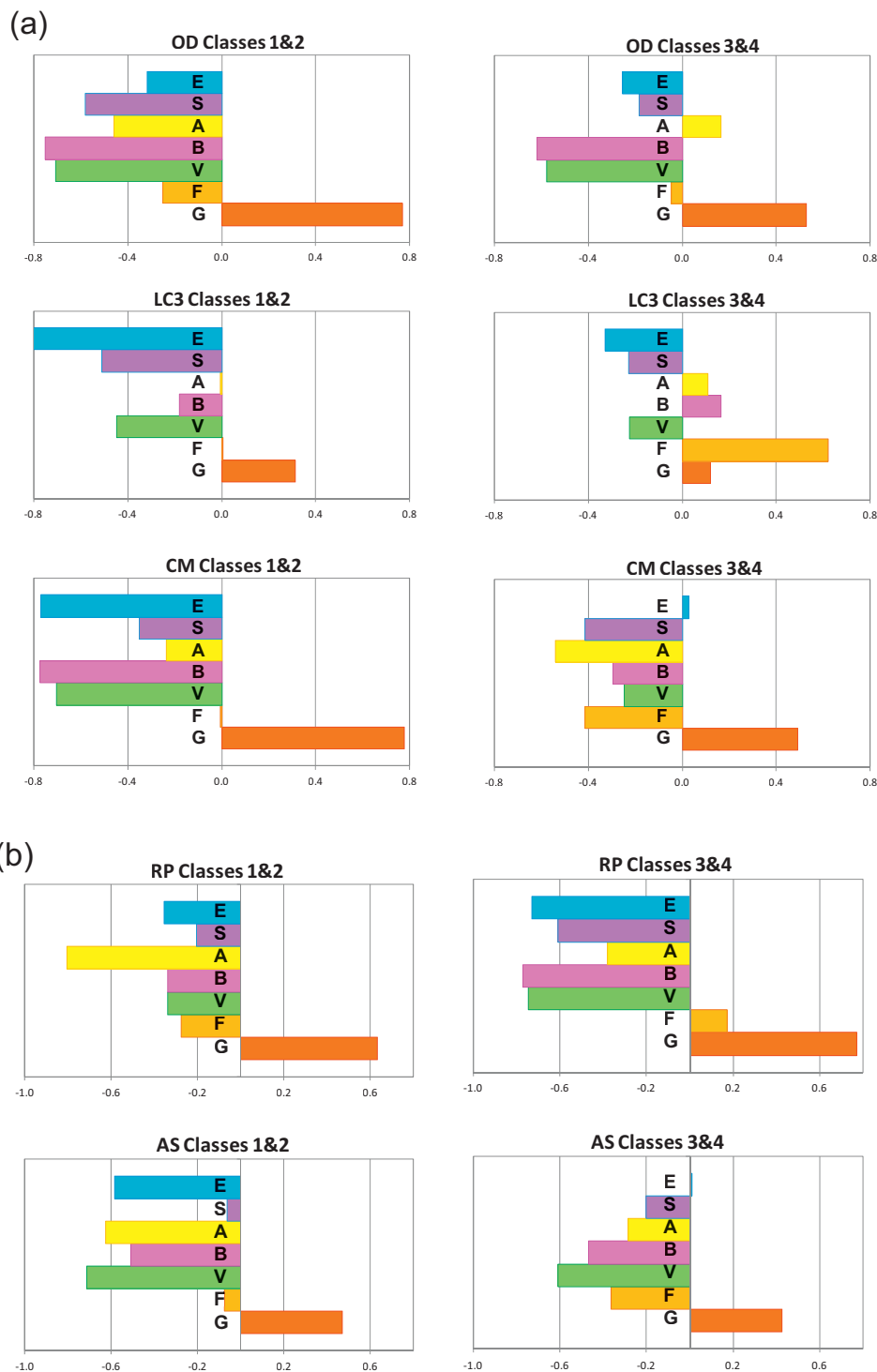


Fig. 5. Selected discriminant analysis between early eluting and late eluting racemates for the 16 commercial columns in Table 1 using the seven molecular descriptors of the modified solvation parameter model as variables. Negative features are common to early eluting racemates (class 1 and class 3), positive features are common to late eluting racemates (class 2 and class 4). (a) Cellulose CSP, (b) amylose CSP.

and possibly the same silica support, the preparation process could just change the higher order structure of the CSP and significantly modify their chiral recognition ability. Individual differences are further discussed below.

3.3. Detailed comparison of stationary phase chemistry

3.3.1. Cellulose-type chiral stationary phases

3.3.1.1. Influence of the aromatic ligand (phenyl vs. 3,5-dimethylphenyl). Both Reprosil-OM and Reprosil-CM are cellulose CSP in which the chiral selector is coated on the same silica support. As they were provided by the same manufacturer (Dr. Maisch) it was expected that their comparison should mostly depend on the different ligands. Indeed, they should only differ by the presence of methyl groups on the phenyl ring (two $-\text{CH}_3$ groups on Reprosil-OM vs. none on Reprosil-CM).

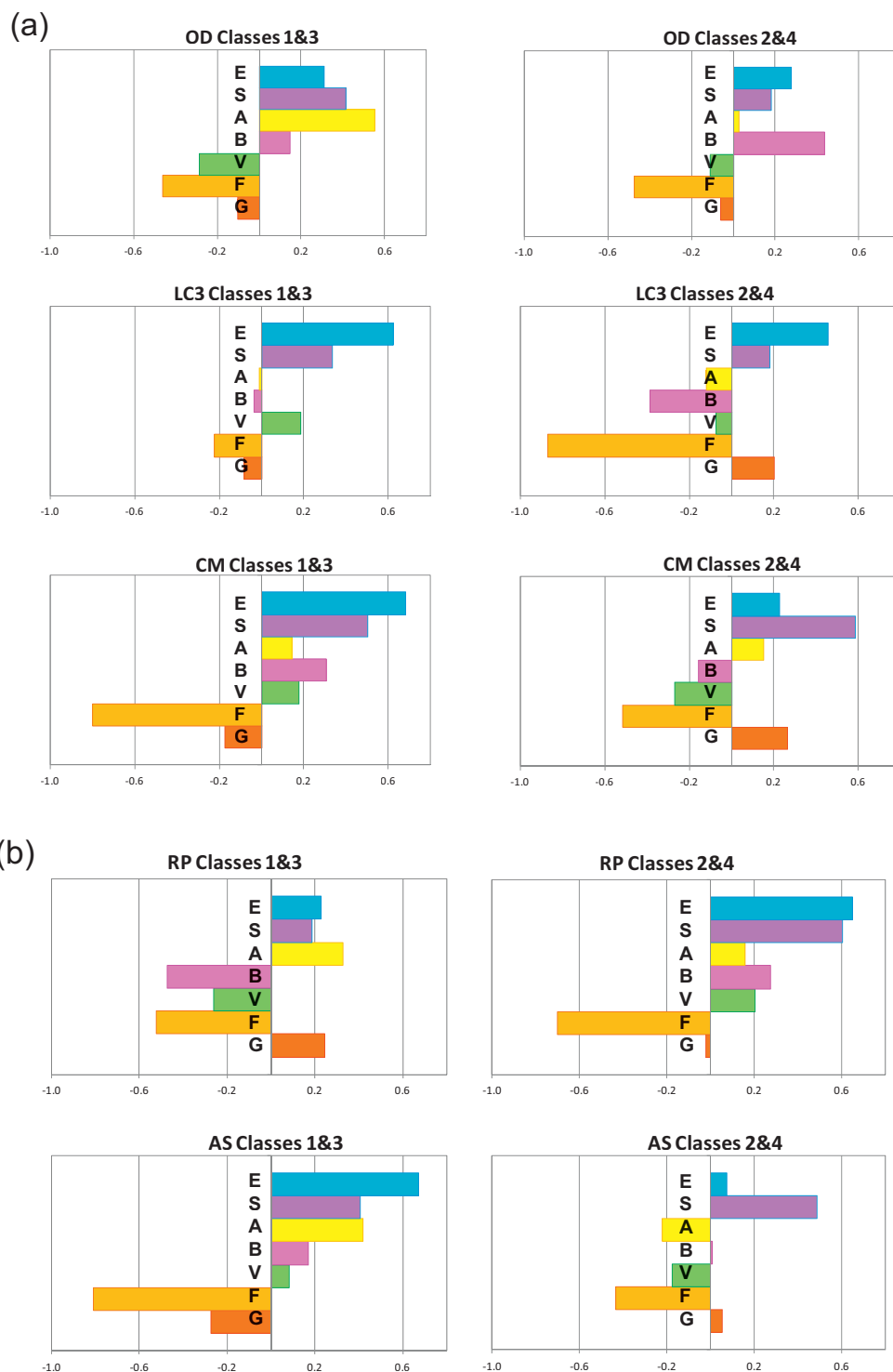


Fig. 6. Selected discriminant analysis between separated and non separated racemates for the 16 commercial columns in Table 1 using the seven molecular descriptors of the modified solvation parameter model as variables. Negative features are common to non-separated racemates (class 3 and class 4), positive features are common to separated racemates (class 1 and class 2). (a) Cellulose CSP, (b) amylose CSP.

Retention on both Reprosil-OM and Reprosil-CM (Fig. 3a) is driven by the contribution of strong π - π interactions (e term). Induced dipole - dipole interactions may also contribute to the large e values observed. Hydrogen binding sites are also highly significant (a - and b -terms). The large negative v value observed for Reprosil-CM means that a large solute would be less retained on this CSP than a small solute with otherwise equivalent properties.

The negative g value can be interpreted as issuing from steric resistance to insertion for large spherical molecules.

Generally, the presence of electron-donating substituents modifies the electron density on the phenyl ring by inductive effect, leading to stronger π - π interactions. Some increase of the e value is thus observed on the OM phase, as compared to the CM phase.

Moreover, the presence of methyl substituents modifies the polarity of the carbamate moieties. While the a value does not seem to be affected, the b value is significantly lower on Reprosil-OM than Reprosil-CM, indicating that the acidity of $-NH$ groups (b term) is significantly reduced by the presence of methyl groups. Stronger interactions with basic compounds can thus be expected on Reprosil-CM. Indeed, most of these species of the solute set were effectively more retained on Reprosil-CM than Reprosil-OM.

Another significant difference is observed for the ν and g terms. The methyl substituent likely alters the three dimensional polysaccharide structure of Reprosil-CM comparing to Reprosil-OM. While it was expected that the absence or presence of methyl substituents should impact steric resistance to insertion in the chiral cavities, the result observed is somewhat counterintuitive: the presence of methyl groups on the aromatic rings was expected to limit the entry of bulky and spherical molecules. However, the contrary is observed as large and spherical molecules appear to have limited access to the stationary phase when methyl groups are absent (Reprosil-CM phase). As pointed out by a reviewer for this paper, it is possible that the presence of methyl groups disrupts the higher degree structuring of the CSP polymer, resulting in a looser structure for Reprosil-OM, thus easier to penetrate. It is also possible that the size and shape of the chiral cavities is affected with the ligands in Reprosil-CM being more curled up than in Reprosil-OM. Hence, Reprosil-OM may present larger cavities than Reprosil-CM. The stronger retention observed for large polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) on Reprosil-OM seems to support this possibility. Our explanation is also consistent with past studies performed on the effect of various substituents of *tris*-phenylcarbamate residues using 1H NMR and IR: the authors attributed the differences in the separation behaviour to the steric hindrance from the substituents on the polymer chain [31].

Globally, the presence or absence of methyl groups on the phenyl-carbamate ligands modifies the intensity of π – π and hydrogen-bonding interactions with carbamate moieties, and induces changes in the shape of chiral cavities shapes and/or in their accessibility.

The enantioseparation features of the Reprosil-CM column can also be discussed (Fig. 6a). It is not our purpose to discuss every single difference between the separation models as some differences are of little significance. However, some general conclusions can be drawn.

Solute aromaticity (E) and the presence of dipoles (S) pointing to the right hand side of the figure indicate that these characteristics are favourable to successful enantio-recognition. For instance, *trans*-chlorstilbene oxide and 1,2-epoxyethylbenzene both belong to class 2 on the Reprosil-CM column. The former is well resolved on Reprosil-CM with $\alpha = 1.39$ (Fig. 7) although it is a relatively large molecule, a feature that may be detrimental to its accessing the chiral cavities on this column. When the solute aromaticity decreases (1,2-epoxyethylbenzene), the chiral discrimination is reduced as well ($\alpha = 1.03$).

Another significant example is provided with the three parent structures of propionic acids: fenoprofen, suprofen and indoprofen (Table 4) that are late eluting racemates (classes 2 and 4). The increased values of E , S and B , and decreased G values cause a significant retention increase for this series of compounds. Besides, increased E and S values and decreased F values are favourable features for enantioseparation on the Reprosil-CM column, thus fenoprofen enantiomers that have the lowest aromaticity and largest flexibility are not resolved, while partial and complete enantioresolution are observed for suprofen and indoprofen enantiomers respectively.

3.3.1.2. Influence of the polar embedded group: carbamate vs. ester ligands. Several columns in our study can be selected to compare

the impact of carbamate vs. ester ligands: Chiralcel OD and Chiralcel OJ; Lux Cellulose-1 and Lux Cellulose-3; Reprosil-OM and Reprosil-JM. Indeed, all three couples of columns were provided by the same manufacturers (Daicel, Phenomenex or Dr. Maisch), which should ensure that the differences observed should essentially be related to ligand differences.

The system constants obtained with Eq. (1) on the three couples of cellulose phases can be observed in Fig. 3a. Retention on the cellulose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralcel OD) has been thoroughly described in previous studies [20,28]. Retention on the cellulose *tris*-(4-methylbenzoate) is driven by the large contribution of e coefficient. It is related to strong π – π interactions between aromatic solutes and phenyl or carbonyl groups of the CSP. It is also possible that induced dipole – dipole interactions contribute to the large e values observed. This e contribution is consistently larger on the ester phases than on the carbamate phases.

According to the models, the second most significant contribution to retention on both ester and carbamate phases is hydrogen-bonding interactions with acidic compounds (a value). These interactions may involve carbonyl groups (part of the ligand), or the silica support, or the surface chemical modification of the silica support, or even methanol molecules adsorbed onto the surface of the CSP.

In contrast, the retention of polar and basic compounds is not favoured on ester phases (negative s and b coefficients) because of the absence of hydrogen donor groups in the benzoate moieties as compared to $-NH$ groups in the carbamate functions. In our data set, basic compounds were clearly much less retained on ester phases.

One structural feature (g coefficient) also appears to differ between the two groups of columns as it is negative on the carbamate phases (unfavourable to retention) and zero on the ester phases (not contributing to retention). It indicates that spherical molecules are less retained than flat ones on the former CSP while this feature is not making any difference for the latter CSP.

In the literature, it is inferred that the main interaction sites on ester CSP are the polar carbonyl groups part of the ester functionalities [32–34]. First, the *para*-substitution on the phenyl ring ensures less steric constraints around the binding sites [35]. However, the contribution of the hydrogen acceptor groups (carbonyl groups) is rather similar on both carbamate and ester phases (a coefficient). On ester CSP, the mechanism relies on a perfect balance between intermolecular (contribution of $C=O$ groups) and intramolecular interaction that maintain higher order structure.

The comparison of DA figures for the couples of OD/OJ columns yields the following general trends:

- For compounds in classes 1 and 3, opposite effects of the acidic character are observed as acidic compounds are favoured on carbamate CSP but not favoured on ester phases.
- For compounds in classes 1 and 3, opposite effects of the molecular volume are observed as large molecules are not favoured on carbamate phases but favoured on ester phases. The opposite is observed for classes 2 and 4.
- For compounds in classes 2 and 4, opposite effects of sphericity are observed as spherical molecules are not favoured on carbamate phases but favoured on ester phases.
- For compounds in all classes, aromaticity is more favourable on ester than on carbamate phases.

Some examples can be selected to illustrate these trends.

First of all, we will look at mandelic acid that is a highly acidic small molecule (Fig. 8). On all OD-type and OJ-type phases, it is eluted before the predicted retention time, thus should belong to class 1 or class 3. On all carbamate phases, it was baseline resolved (with separation factors of 1.61, 1.65 and 1.46 on Chiralcel OD, Lux

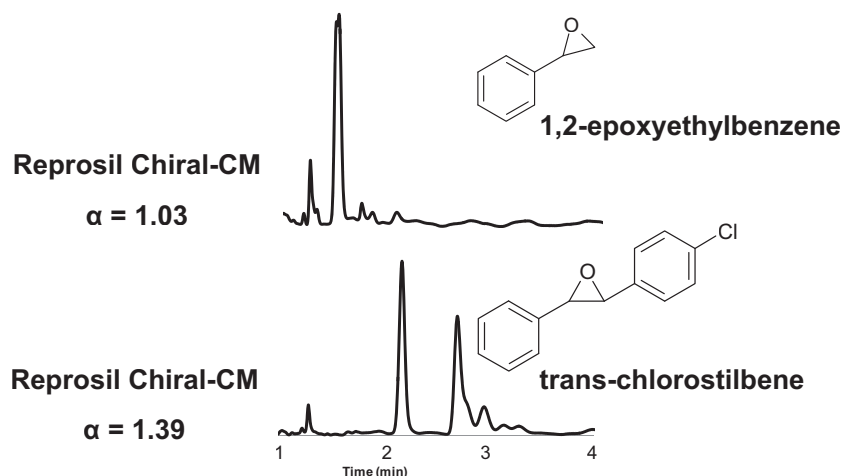


Fig. 7. Separation of 1,2-epoxyethylbenzene and trans-chlorostilbene oxide enantiomers on Reprosil Chiral-CM evidencing the favourable effect of aromaticity on this column.

Table 4

Separation of propionic acid drugs on Reprosil Chiral-CM. (see text for details).

Compound	Structure	E	S	A	B	V	F	G	k E1	k E2	α
Fenoprofen		1.390	1.63	0.57	0.78	1.880	2.105	1.307	3.25	3.25	1.00
Suprofen		1.510	1.89	0.57	0.81	1.903	2.105	1.131	17.82	18.99	1.07
Indoprofen		1.920	2.30	0.57	1.14	2.112	1.304	1.018	43.40	51.40	1.19

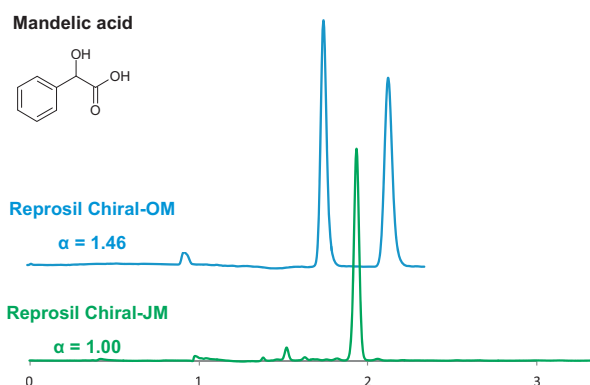


Fig. 8. Separation of mandelic acid favoured by hydrogen bonding on carbamate phases (Reprosil-OM) but not favoured on ester phases (Reprosil-JM).

Cellulose-1 and Reprosil-OM respectively), thus belonged to class 1. On all ester phases, the enantiomers co-eluted thus it belonged to class 3. Comparing Fig. 6a, as indicated above, acidity is a favourable feature to enantioseparation on carbamate phases but not favourable on ester phases, which agrees well with separation

results for mandelic acid. The chromatographic comparison of Reprosil phases is presented in Fig. 8.

Secondly, the effect of aromaticity on enantioseparation can be observed with 1-(2-naphthyl)-ethanol (Fig. 9). On all six phases, it is eluted after the predicted retention time (with comparable retention on all columns), thus should belong to class 2 or class 4. As the enantiomers were separated on all these columns, it is always in class 2. Fig. 6a indicates that aromaticity is more favourable to enantioseparation on ester phases, and indeed separation factors were improved: α was 1.14, 1.16 and 1.19 on Chiralcel OD, Lux Cellulose-1 and Reprosil-OM respectively, while it was 1.30, 1.28 and 1.28 on Chiralcel OJ, Lux Cellulose-3 and Reprosil-JM respectively. The example of Chiralcel phases is presented in Fig. 9.

3.3.2. Amylose-type CSP

3.3.2.1. AD-type columns. Comparison of retention characteristics of AD clones in Fig. 3b indicates that steric features seem to be the most significant differences between the columns produced by different manufacturers, as the v and g terms (related to size and sphericity) are the most varying. Also the contribution of the b term (interaction with basic compounds) is somewhat larger on the clones than on Chiralpak AD. Chiralpak IA, the immobilized

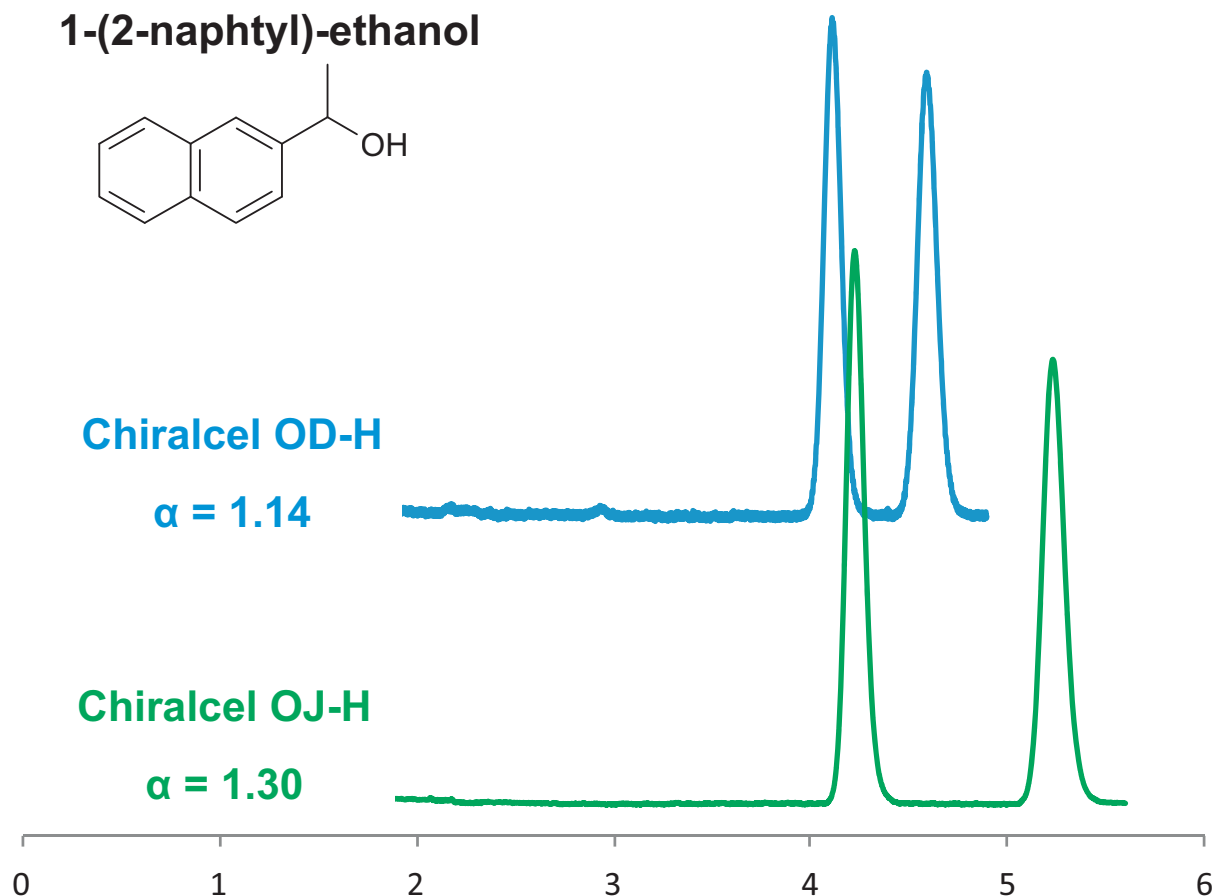


Fig. 9. Separation of 1-(2-naphthyl)-ethanol favoured by enhanced π – π interactions on ester phases (Chiralcel OJ) compared to carbamate phases (Chiralcel OD).

version of Chiralpak AD, is also dissimilar in the small positive s term (dipole–dipole interactions).

In our previous paper comparing OD-type phases [20], we speculated that an increased b term could be due to less coated or immobilized polymer or a difference of availability of residual groups at the surface of the silica support. Comparing the retention behaviour ($\log k$ vs. $\log k$) of achiral species on Chiralpak AD versus RegisPack and AmyCoat indicates a difference of phase ratio between the phases. We can then suppose that the coverage rate of the polysaccharide on the matrix is larger on Chiralpak AD than on RegisPack and AmyCoat.

A detailed description of the original amylose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) DA model is available in a previous study [27]. However, the separation features were quite dissimilar between Chiralpak AD and its clones, as it was expected from the above cluster analysis (Fig. 2b). When comparing the discriminant analysis obtained for the AD generic versions, some features simply had different absolute values, but had similar comparable effects on enantioseparation (favourable or not favourable), while others could even have opposite effects from one column to another. This is not a surprising observation as it was often pointed out that the Chiralpak AD column is quite unique and rather difficult to reproduce. Indeed, Daicel's amylose is known to be difficult to duplicate and compete with, possibly due to a perfect enzymatic control of the amylose polydispersity.

It is also interesting to note that the patterns observed on the DA of classes 1/3 were significantly different from those obtained on classes 2/4 (Fig. 6b), suggesting that the interactions contributing to successful enantioseparation are not the same for early eluting

and lately eluting racemates. It is particularly the case for hydrogen bonding with basic analytes (B term), but also for the opposite effects observed of size (V) and shape (G). This is in contrast with the observations on cellulose phases above (Fig. 6a), where the patterns were rather similar (absolute values changed, but not so much positive or negative effect). This is consistent with the hypothesis that late eluting compounds, which were seen to be smaller in size but more spherical, would enter different chiral cavities and would have a different sterical fit to these cavities. This observation is also in good agreement with previous observations that some “conformational adjustment” driven by hydrogen bonding interactions would rule the separation mechanism [36,37].

One significant feature that can be compared between Chiralpak AD and generic versions is the contribution of hydrogen bonding for the separation of acidic compounds. For instance, the comparison of discriminant analysis shows that the A term is most favourable on the Chiralpak AD phase, while it has a lower value on RegisPack and even lower value on AmyCoat. Enantiomers may engage in stronger hydrogen bonding with the original polysaccharide-based CSP [20]. This is illustrated with the separation of flurbiprofen enantiomers (Fig. 10) where a large separation factor is observed on Chiralpak AD, a smaller one on RegisPack and even smaller on AmyCoat.

Apart from improved solvent compatibility, immobilized CSP have been introduced to enhance the application scope of polysaccharide-based CSP and offer new enantioselectivity profiles. Indeed, the Chiralpak IA phase was the most dissimilar from the AD clones in the cluster analysis (Fig. 2). Various procedures exist to achieve the immobilization of the polysaccharide derivatives [38] on silica gel matrix and afford good performances to these CSP, *i.e.*

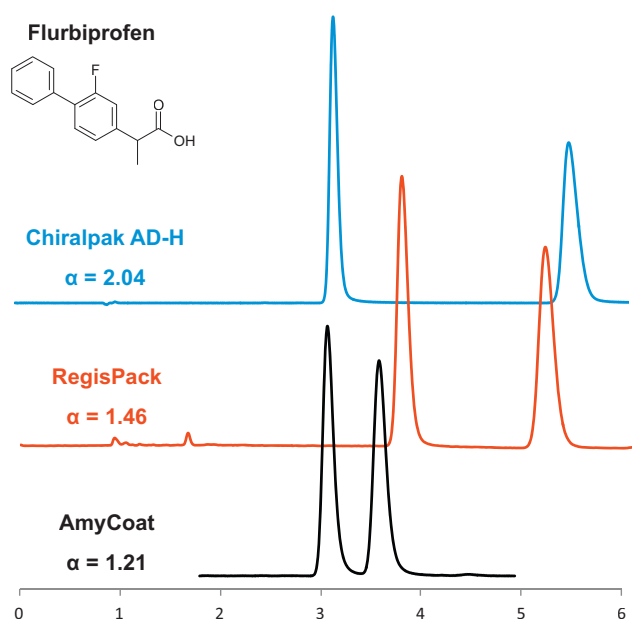


Fig. 10. Separation of flurbiprofen enantiomers favoured by enhanced hydrogen bonding on AD-type phases.

radical polymerization, photoinduced and thermal polymerization, or even covalent bonding. Under similar operating conditions using standard solvents, immobilized phases displayed lower enantioselectivity and smaller success rates than the coated ones (Fig. 1). Lower chiral recognition ability has been reported before in other separation modes by Thunberg et al. [39]. Generally, it is attributed to a difference in the higher order structure. This is in accordance with the small correlation between Chiralpak IA and Chiralpak AD. However, the possibility to use different sorts of solvents on the Chiralpak IA column should increase its overall success rate [40].

3.3.2.2. Effect of different ligands: 3,5-dimethylphenyl vs. (S)- α -methylbenzyl. Chiralpak AS is an amylose-based CSP in which the ligand is chiral itself ((S)- α -methylbenzylcarbamate). Its singular position in the amylose-type phases in the enantioseparation clustering (Fig. 2b) was rather surprising. Indeed, it appears to be the closest column to Chiralpak AD, even closer than any of the AD clones. The backbones of the amylose-based Chiralpak AS and Chiralpak AD polymers have similar helical fold, as inferred from the literature solid-state NMR results [41]. However, the authors also indicated that Chiralpak AS exhibited a non-planar side chain (while the side-chain on Chiralpak AD is rather planar) due to the asymmetric carbon. That resulted in different molecular environment of the chiral cavities in the polymers, leading to different enantioselectivity. While the data here show that Chiralpak AS is not equivalent to Chiralpak AD, there is still some similarity in their enantiorecognition properties.

Comparing their retention properties (Fig. 3b), we can identify different effects of polarity (s term) and steric constraints (v term). Other interactions are identical.

Comparing their separation characteristics (Fig. 6b), some significant differences appear, that are also associated to polarity (E and S terms) and steric constraints (V and G terms). Most particularly, it can be noted that steric constraints have opposite effects when comparing the 1/3 DA and 2/4 DA. This can be illustrated with some sample applications.

Firstly, methyl-*p*-tolylsulphoxide is a small molecule with some sphericity. On both Chiralpak AD and Chiralpak AS, it was eluted after the predicted retention. No separation could be observed on

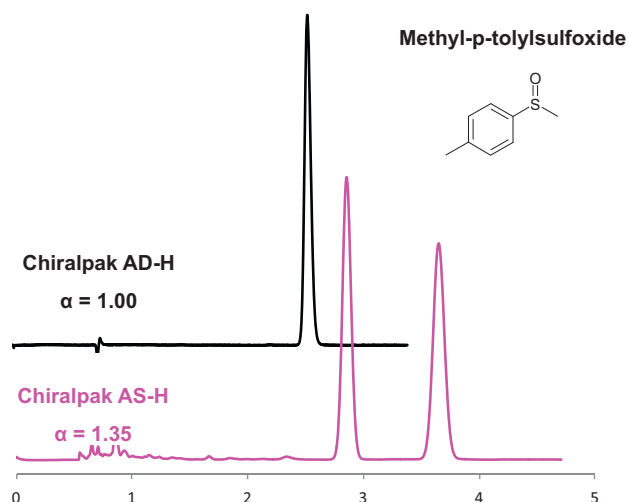


Fig. 11. Separation of methyl-*p*-tolylsulphoxide, a small and rather spherical molecule favoured on Chiralpak AS-H.

Chiralpak AD, but a good enantioselectivity ($\alpha = 1.35$) was observed on Chiralpak AS (Fig. 11). Indeed, it can be observed from the 2/4 DA in Fig. 6b that lately eluting compounds are favoured by their small molecular volume on Chiralpak AS but large volume on Chiralpak AD.

Secondly, 6-methoxyflavanone is a bulky compound (large V) but also quite flat (small G). On both columns, it was eluted after the predicted retention. Because Chiralpak AD favours large molecules and low sphericity, it is favourable to the separation of 6-methoxyflavanone enantiomers ($\alpha = 2.74$). On the contrary, Chiralpak AS by favouring small and spherical molecules is not able to resolve such enantiomers and co-elution was observed (Fig. 12).

3.3.2.3. Impact of silica nature: raw silica versus aminopropyl-bonded silica. Silica treatment has an impact on enantioseparation process. In our last paper, we proposed that some differences between the OD-type phase performances were due to the difference in silica surface among other parameters. It is plausible since (i) the amount of polymer coated on the matrix can differ from one column to another, (ii) the silica support is probably different for different manufacturers and (iii) chemical modification of the silica surface, like amino-propyl bonding, may differ [42].

To study our hypothesis, two materials were compared, one being amylose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on

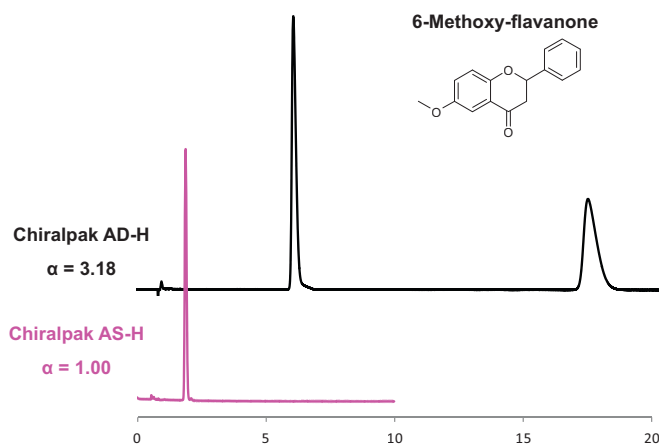


Fig. 12. Separation of 6-methoxyflavanone, a large and rather flat molecule favoured on Chiralpak AD-H.

naked silica (Reprosil Chiral-AM2), a non-commercial CSP kindly provided by Dr. Maisch, while the other one was the commercial version, the same polymer coated on aminopropyl-modified silica (Reprosil Chiral-AM).

At first sight, we can observe that the interactions that control retention should be roughly similar. Comparing the retention data of the achiral set on both phases, high correlation ($R^2 = 0.96$) was measured. It is also visible from the retention models in Fig. 3a that very little differences issue from this surface modification. Only the interactions with hydrogen donors (α coefficient) are slightly lower on Reprosil-AM2 than Reprosil-AM. Thus, in general, acidic racemates were also less retained on Reprosil-AM2. This was not unexpected based on our previous measurement of the similar variations between bare silica and amino-propyl-bonded achiral stationary phases [43]. Additionally, as pointed out by a reviewer, even if the same chiral selector is coated at the same percentage of coating, the question remains is the coating is even to the same extent on the two.

Separation of neutral and acidic racemates suffered little change and the performance of the two columns for such compounds was rather similar with 60% success rate.

The major difference we observed between the two columns was on peak shapes of basic compounds. Indeed, unmodified silica particles induced tailing peak shapes or total retention on Reprosil-AM2 for some basic compounds (like bisoprolol, metoprolol, psiphephrine).

Nelander et al. have discussed about the influence of the silica support on enantioselectivity of Reprosil Chiral-OM, which is based on the same silica matrix as Reprosil-AM. They observed that the retention of neutral compounds was related to accessible silanol groups on the silica support. The addition of an additive (formic acid) was necessary to elute the acidic compounds while basic compounds exhibited tailing peaks. The authors concluded to the contribution of silica support to retention and suppressed the undesired achiral interactions with additives in the mobile phase, thereby achieving better column efficiency and higher enantioresolution [44].

4. Conclusion

All 16 columns of five different selectors were compared using a large number of test compounds for both their success rate and the average separation factor of enantiomeric resolutions in SFC. Chiralpak AD demonstrated to be the most universal phase with the highest success rate. The enantio-resolution success rate did not rank in accordance to CSP chemistry (polysaccharide and ligand), which suggested that column performance varies among different manufacturers of the same CSP chemistry. On the other hand, nearly all columns were nicely grouped in terms of average separation factors in accordance to the CSP chemistry, which confirmed the major role of the CSP chemistry in chiral resolution.

AHC analysis was performed to cluster the columns based on their ability to retain or to discriminate the enantiomers. The results suggested that the clone columns had similar retentability to their parent columns as they clustered well according to retention. However, more dissimilarity was observed among the six amylose columns, while cellulose phases were more similar.

Chemometric strategies were applied to characterize the columns in terms of their retention characteristics assessed by the solvation parameter model and separation capabilities assessed by discriminant analysis. The unique design of the discriminant analysis (two by two) allowed us to unravel the structural features that are more or less favourable for retention and/or chiral recognition on the different stationary phases. In particular, we have shown how the effects of aromaticity, hydrogen bonding, size and shape features could vary between the different columns. The principal observations resulting from quantitative structure–retention relationships and discriminant analyses are summarized in Table 5.

Obviously, the situation is not always as simple as the above selected examples because a combination of effects is participating in the process, in a harmonious or competitive fashion. Nevertheless, our study results provided some insights on the difference and similarity among the non-halogenated polysaccharide CSP in terms of retention and selectivity at a molecular level, which could be of value when selecting a column for a given enantioseparation.

Table 5
Summary of observed retention and separation properties observed with QSRR and DA.

Column	Notable retention properties	Notable enantioseparation properties
OD		
LC1	Retention of aromatics and acids	Flexibility is deleterious to separation
RC	Some retention of bases	Large and spherical molecules are not favoured
CC	Some steric resistance towards spherical molecules	H-bonding is essentially favourable to spherical compounds
OM		Dipole–dipole and π – π interactions are favourable
IB		
OJ	Retention of aromatics and acids	Flexibility is deleterious to separation
LC3	No retention of proton acceptors	Large and flat molecules are favoured
JM	No contribution of molecule sphericity	Small and spherical molecules are favoured
		H-bonding is not participating or deleterious to separation
		Dipole–dipole and π – π interactions are favourable
CM	Retention of aromatics, acids and bases	Flexibility is deleterious to separation
	Strong steric resistance towards large and spherical molecules	Large and flat molecules are favoured
		Small and spherical molecules are favoured
		Dipole–dipole and π – π interactions are favourable
AD	Retention of aromatics and acids	Flexibility is deleterious to separation
RP	Some retention of bases	Large and flat molecules are favoured
AC	Some steric resistance towards large and spherical molecules	Small and spherical molecules are favoured
AM		H-bonding is favourable to large and flat acids
IA		
AS	Retention of aromatics and acids	Flexibility is deleterious to separation
	Some retention of bases	Large and flat molecules are favoured
	Some steric resistance towards large and spherical molecules	Small and spherical molecules are favoured
		H-bonding is favourable to large and flat molecules

Acknowledgments

Waters is greatly acknowledged for the UPC² system let at our disposal. We are very grateful to the manufacturers who kindly provided the stationary phases for this study: Bernt Larsson and Margaretha Svensson (Akzo Nobel), Albin Maisch (Dr. Maisch), Magali Dupin, Gilles Jaouen and Tivadar Farkas (Phenomenex) and Jelena Kocergin (Regis Technologies).

References

- [1] Y. Zhang, D.-R. Wu, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 571.
- [2] H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat, *Drug Discov. Today* 9 (2004) 105.
- [3] M. Maftouh, C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y.V. Heyden, C. Picard, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 67.
- [4] M.A. Lindskog, H. Nelander, A.C. Jonson, T.R. Halvarsson, *Drug Discov. Today*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.021>
- [5] M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814.
- [6] L.T. Taylor, *J. Sup. Fluids* 47 (2009) 566.
- [7] W. Ren-Qi, O. Teng-Teng, N. Siu-Choon, T. Weihua, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 83.
- [8] C. Hamman, M. Wong, I. Aliagas, D.F. Ortwine, J. Pease, D.E. Schmidt Jr., J. Vic-torino, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 310.
- [9] C. Perrin, N. Matthijs, D. Mangelings, C. Granier-Loyaux, M. Maftouh, D.L. Mas-sart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 119.
- [10] C. Perrin, V.A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 69.
- [11] H. Ates, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 57.
- [12] N. Bargmann-Leyder, A. Tambuté, M. Caude, *Chirality* 7 (1995) 311.
- [13] J.Y. Jin, W. Lee, J.H. Park, J.J. Ryoo, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 30 (2007) 1.
- [14] Z. Wang, S. Li, M. Jonca, T. Lambros, S. Ferguson, R. Goodnow, C.-T. Ho, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 1206.
- [15] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 26.
- [16] I. Kartoza, M. Kanyonyo, T. Happaerts, D.M. Lambert, G.K.E. Scriba, B. Chankve-tadze, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 457.
- [17] B.z. Visegrády, T.n. Konecsni, N. Grobuschek, M.G. Schmid, F. Kilár, H.Y. Aboul-Enein, G. Gübitz, *J. Biochem. Biophys. Methods* 53 (2002) 15.
- [18] S. Mohr, M. Taschwer, M.G. Schmid, *Chirality* 24 (2012) 486.
- [19] J.H. Kennedy, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 219.
- [20] S. Khater, Y. Zhang, C. West, *J. Chromatogr. A* 1303 (2013) 83.
- [21] A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toga, *Chro-matographia* 19 (1984) 280.
- [22] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr.* 363 (1986) 173.
- [23] T. Zhang, M. Schaeffer, P. Franco, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 96.
- [24] A. Ghanem, L. Naim, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 171.
- [25] A. Tarafder, K. Kaczmariski, M. Ranger, D.P. Poe, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 132.
- [26] C. Wang, Y. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1281 (2013) 127.
- [27] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2033.
- [28] C. West, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2019.
- [29] R.W.H. Perera, I. Abraham, S. Gupta, P. Kowalska, D. Lightsey, C. Marathaki, N.S. Singh, W.J. Lough, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 189.
- [30] R.B. Kasat, S.Y. Wee, J.X. Loh, N.-H.L. Wang, E.I. Franses, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 81.
- [31] Y. Okamoto, K. Hatano, R. Aburatani, K. Hatada, *Chem. Lett.* 18 (1989) 715.
- [32] R. Cirilli, S. Alcaro, R. Fioravanti, R. Ferretti, A. Bolasco, B. Gallinella, C. Faggi, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5653.
- [33] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1020.
- [34] T. O'Brien, L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P.H. Toma, D.A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker, N. Grinberg, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1999.
- [35] I.W. Wainer, R.M. Stiffin, T. Shibata, *J. Chromatogr.* 411 (1987) 139.
- [36] T.D. Booth, I.W. Wainer, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 157.
- [37] T.D. Booth, I.W. Wainer, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 205.
- [38] E. Francotte, D. Huynh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 421.
- [39] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 72.
- [40] L. Miller, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 261.
- [41] R.B. Kasat, N.-H.L. Wang, E.I. Franses, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1676.
- [42] S.J. Grieb, S.A. Matlin, A.M. Belenguer, H.J. Ritchie, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 271.
- [43] C. West, S. Khater, E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 182.
- [44] H. Nelander, S. Andersson, K. Öhlén, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9397.



Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography IV. Chlorinated polysaccharide stationary phases



Syame Khater^a, Yingru Zhang^b, Caroline West^{a,*}

^a Université d'Orléans, ICOA, CNRS UMR 7311, Pôle de Chimie, rue de Chartres, 45067 Orléans Cedex 2, France

^b Bristol-Myers Squibb, PO Box 4000, Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08453-4000, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 6 June 2014

Available online 12 June 2014

Keywords:

Chemometrics

Chlorinated polysaccharides

Linear solvation energy relationship (LSER)

Quantitative structure–retention

relationships (QSRR)

Solvation parameter model

Supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

The chiral recognition mechanism for a successful enantioseparation on polysaccharide stationary phases are still poorly understood. In this series of papers, we aim to provide some insight into the retention and separation mechanisms occurring in enantioselective supercritical fluid chromatography (SFC). This paper presents a thorough investigation on chlorinated polysaccharide chiral stationary phases (CSP) comprising five coated and three immobilized phases from different manufacturers. The columns are also compared to four non-chlorinated phases to unravel the most significant differences brought about by the introduction of electron-withdrawing atoms on the aromatic ligands. Chemometrics are used to (i) get an overview of all columns (cluster analysis), (ii) describe retention (modified solvation parameter model) and (iii) describe enantioseparation (discriminant analysis). Sample applications are provided to support the discussion.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Analysis and preparation of enantiomerically pure compounds are a major topic of interest in the field of pharmaceutical drug discovery and development. Stereoisomers often exhibit different biological activities, and undesired isomers can contribute to a reduction in efficiency and safety of the drugs. In this context, stereoselective chromatographic techniques have become very popular as they offer not only analytical solutions but also preparative applications. Among the chromatographic approaches, liquid chromatography (HPLC) and supercritical fluid chromatography (SFC) are dominating the scene and are often seen as complementary techniques.

The application of SFC, using the widespread availability of chiral stationary phases (CSP), has expanded rapidly [1]. SFC has been recognized as a fast (short columns, gradient elution, parallel screening) and green technology, especially at a preparative scale, as compared to normal-phase HPLC (NPLC). The majority of published SFC enantiomeric separations utilize CSP that were pioneered by Okamoto et al., based on chemically derivatized amylose or cellulose, coated or immobilized on silica [2,3].

The constant innovation in column technology reminds us that a universal CSP does not exist yet. Although the large panel of available CSP offers us the opportunity of tuning selectivity to achieve resolution, the selection of an appropriate chromatographic system is still a time-consuming, hit-and-miss process.

Both in academic and industrial settings, many different strategies are currently applied in order to rapidly select an appropriate chromatographic system for a given separation: high-throughput, multi-column parallel screening [4,5], simulated moving column [6], selection of columns to achieve high complementarity [7,8]. However, understanding of the mechanisms contributing to enantioselective recognition, and ultimately predicting an enantioseparation remain the most challenging goal in the field of enantioselective separation [9].

Polysaccharide CSP are made of a supporting phase (silica gel) and a polysaccharide that is modified with a ligand (most often aromatic groups) and coated or immobilized on the supporting phase. Chlorine-containing polysaccharide CSP were introduced on the market in recent years, and some research is needed to evaluate their utility for chiral analysis. The tris-(halomethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose were first synthesized and evaluated by Chankvetadze et al. 20 years ago [10]. Chlorine atoms exert electron-withdrawing effects on the phenyl moieties that may modify the physical and chemical properties of the CSP. Besides, Chankvetadze's studies have shown a correlation between the chiral recognition abilities and

* Corresponding author. Tel.: +33 238494778; fax: +33 238417281.
E-mail address: caroline.west@univ-orleans.fr (C. West).

electronic and structural properties of the CSP [11–13]. They were first available under the brand Sepapak and then commercialized as Lux chiral columns by Phenomenex. Nowadays, a competitive market is open for vendors producing chlorinated polysaccharide CSP such as Regis chiral support (RegisPack CLA-1), Chromega columns (Chromega chiral CC2, CC3, CC4) or columns from Daicel (Chiralpak AZ & AY and Chiralcel OZ & OX), to name a few. Past studies carried out in HPLC and SFC indicate that chlorine-containing phases would show additional enantioselectivity abilities compared to the polysaccharide-based selectors without chlorine [11]. Thus placing them in the primary chiral screening should improve screening success [14].

Some of these chlorinated CSP are also available as immobilized phases, thereby extending the possibilities of using diverse organic solvents to improve selectivity, as well as sample solubility and yields at preparative scales. For instance, cellulose (3,5-dichlorophenylcarbamate) is available in immobilized version from Daicel (Chiralpak IC) and as a coated prototype from Phenomenex (Sepapak-5). Chiralpak IF is the immobilized version of amylose (3-chloro-4-methylphenylcarbamate).

Some other chlorinated polysaccharides were never available as coated phases due to high solubility in the mobile phases, while they are now available as immobilized CSP from Daicel. For instance, amylose (3-chlorophenylcarbamate) and amylose (3,5-dichlorophenylcarbamate) each possess a unique chiral selector, and are marketed under the name of Chiralpak ID and IE, respectively.

The evaluation of these phases has been performed under NPLC, reversed-phase (RPLC) and polar organic solvent (POSC) modes [15,16]. Recently, some articles have reported their potential under SFC conditions [17,18].

We report here-in an in-depth evaluation of five coated and three immobilized chlorinated polysaccharide chiral stationary phases in terms of retention and enantioselectivity observed in supercritical fluid chromatography, with the help of chemometrics. They are also compared to two coated and two immobilized non-chlorinated polysaccharides to shed some light on the role played by chlorine substituents in chiral recognition. They are compared based on the measured retention of 230 achiral compounds and the enantioselectivity of 130 racemates. Cluster analysis and quantitative structure–retention relationships based on a modified version of the solvation parameter model are used to assess the differences in non-enantioselective interactions contributing to retention, while discriminant analysis is used to unravel the structural features contributing to successful enantioselective separations.

2. Material and methods

2.1. Stationary phases

In this paper, 11 commercialized and one non-commercial CSP were used. The chemical structures and dimensions are presented in Table 1. Only one column was a non-commercial CSP of cellulose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate) coated silica gel (Sepapak-5) and was kindly provided by Phenomenex to compare with the same polymer immobilized on silica (Chiralpak IC).

Because the columns do not all have the same dimensions, only retention (k) and separation factors (α) will be considered. Column efficiency and resolution will not be compared due to differences among the column lengths and particle sizes. The internal pressure was not exactly constant for all columns, because inlet pressure depends on column length and particle size although outlet pressure was maintained constant for all columns ($P_{\text{outlet}} = 150$ bar). However, density variations from column to column should be

limited under the operating conditions of our study (low temperature and high back-pressure) as the fluid compressibility is lessened. Recently, Tarafder et al. discussed the effect of pressure and density in the sub- and super-critical area. The authors recommended operating under conditions of low compressibility of CO_2 to avoid density variation along the column and poor column efficiency [19]. Besides, it was shown that pressure does not affect enantioselectivity in dense fluid conditions such as the ones we are using here [20].

2.2. Chemicals

The solvent used was HPLC-grade methanol (MeOH) provided by VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Carbon dioxide of industrial grade 99.5% was provided by Messer (Puteaux, France). Solutions of all test compounds were prepared in MeOH with concentrations in the range 100–1000 ppm. Our set of test compounds comprised 230 achiral molecules and 130 racemates obtained from a range of suppliers. The majority of the 130 racemates were from commercial sources while a small proportion of them were in-house synthesized products whose structures are confidential. The complete lists of compounds can be found in our previous works [21,22].

2.3. Chromatographic system

The Waters Acquity UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²) was equipped with a binary solvent delivery pump compatible with mobile phase flow rates up to 4 mL min^{-1} and pressures up to 414 bar, an autosampler that included partial loop volume injection system, a backpressure regulator, two column ovens (one compatible with 150 mm length columns and the other one compatible with 250 mm length columns) and a PDA detector. The Empower software was used for system control and data acquisition.

The mobile phase used in this study is CO_2 –MeOH 90:10 (v/v). Flow rate was 3 mL min^{-1} . Temperature was set at 25°C and the outlet pressure was maintained at 150 bar for all columns. While additives are commonly used to enhance peak shape (*i.e.* peak tailing and broadening) of ionisable compounds, we decided not to use any of them in the mobile phase for this particular study. Additives may adsorb onto the CSP and complicate the understanding of chiral separation mechanism. Our present goal is to improve understanding of chiral separations, not to optimize them, so additives effect shall be the topic of further studies.

Other conditions, used for testing the stability of Sepapak-5, are detailed in the main text.

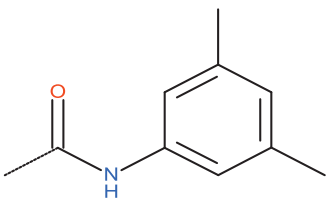
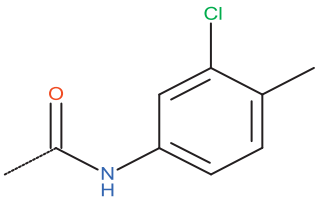
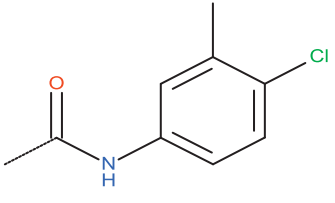
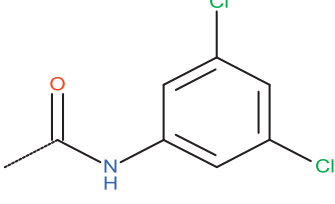
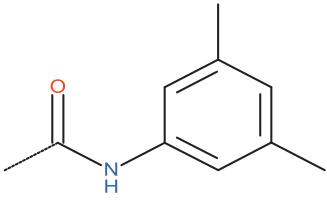
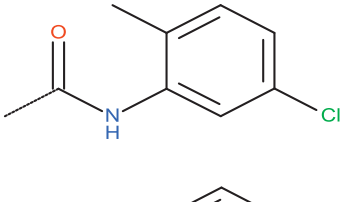
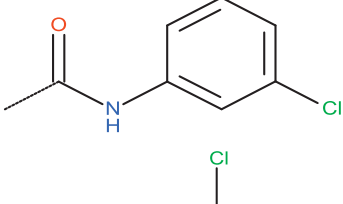
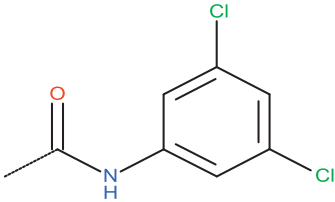
Injection volume was $1 \mu\text{L}$ for all compounds. Retention factors (k) were calculated based on the retention time t_R , determined using the peak maximum (even when tailing did occur, for some of the most basic compounds) and on the hold-up time t_0 measured on the first negative peak due to the unretained dilution solvent.

2.4. Data analysis

All multivariate data analyses were performed using XLStat 7.5 software (Addinsoft, New York, NY, USA). The quality of the QSRR fits was estimated using the overall correlation coefficient (r), adjusted determination coefficient (R_{adj}^2), standard error in the estimate (SE) and Fischer F statistic. The statistical significance of individual coefficients was evaluated using the t -ratio, which is defined as the ratio of the regression coefficient to its standard error. For agglomerative hierarchical clustering (AHC), Ward's method was used to cluster the normalized data, and the Euclidean distance defined the distance between two clusters.

Table 1

12 columns characterized and compared in this study.

Designation	Column	Manufacturer	Polysaccharide	Ligand	Dimensions (mm)	Particle size (μm)
LC1	Lux Cellulose-1	Phenomenex	Cellulose		250 × 4.6	5
IB	Chiralpak IB	Daicel			150 × 4.6	3
LC2	Lux Cellulose-2	Phenomenex	Cellulose		250 × 4.6	5
LC4	Lux Cellulose-4	Phenomenex	Cellulose		250 × 4.6	5
SP5	Sepapak-5	Phenomenex	Cellulose		150 × 4.6	5
IC	Chiralpak IC	Daicel			150 × 4.6	5
RP	RegisPack	Regis Tech.	Amylose		250 × 4.6	5
IA	Chiralpak IA	Daicel			150 × 4.6	3
LA2	Lux Amylose-2	Phenomenex	Amylose		250 × 4.6	3
RPCLA	RegisPack CLA-1	Regis Tech.			250 × 4.6	5
ID	Chiralpak ID	Daicel	Amylose		150 × 4.6	5
IE	Chiralpak IE	Daicel	Amylose		150 × 4.6	5

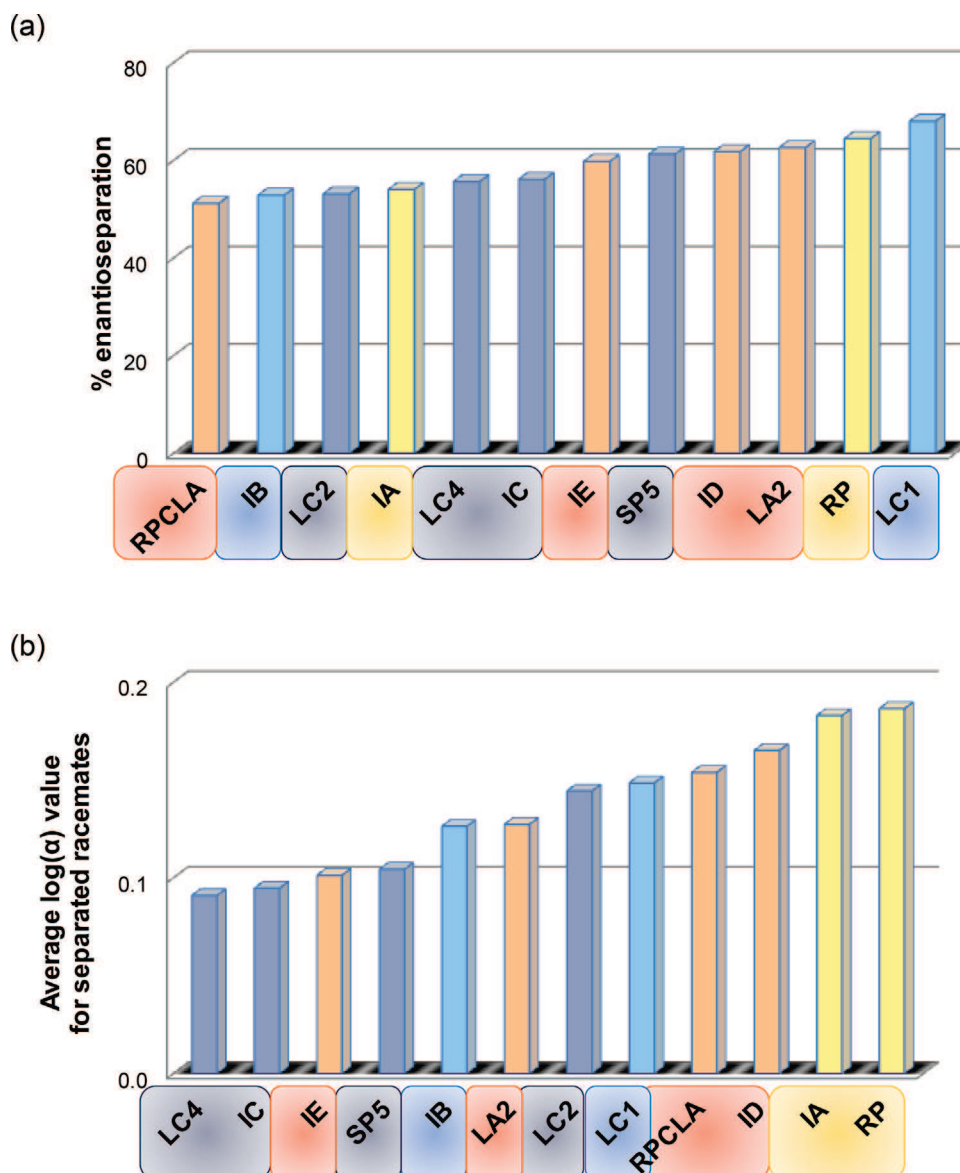


Fig. 1. Overall performance observed on the 12 columns (see Table 1 for identification). (a) Success rate measured on each chiral stationary phase. (b) Average separation factors for separated racemates. Font colours are used to evidence columns with similar stationary phase chemistry: cellulose or amylose, chlorinated or not (see on-line version for colours). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The quality of discriminant analyses (DA) was estimated based on ROC (receiver operating characteristics) curves and contingency tables.

Abraham solute descriptors (E, S, A, B and V) were extracted from an in-house database established from all available literature on the solvation parameter model, or, for those compounds that cannot be found in the literature, calculated with the Absolv Webboxes program, based on ADME Boxes version 3.5 (Pharma Algorithms, ACD Labs, Toronto, Canada). Additional descriptors (F and G) were computed in-house with MOE 2009.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Canada), and QikProp 2009/08/20 (Schrödinger, Camberley, UK) [21]. A stochastic conformational analysis was performed with MOE 2009.10 with the following parameters: maximum number of iterations 10 000; RMS gradient 0.005; maximum number of rejected structures 50; MM iteration limit 500; RMSD limit 0.25; strain cut off 1; conformation limit 1 (so as to retrieve only the conformation with the minimum energy).

The complete table of descriptors for achiral and chiral compounds can be found in previous papers [21,22].

3. Results and discussion

3.1. General overview

3.1.1. Based on success rates

Eight chlorinated and four non-chlorinated CSP were evaluated to identify the specific characteristics that could drive industrial users to integrate chlorinated CSP in the primary chiral screening protocol. First of all, the 12 CSP were classified in order to evaluate their relative performance towards a wide range of compounds. To help reading these classification, the columns are coloured according to their polysaccharide (amylose or cellulose) and ligand (chlorinated or not). The bar charts (Fig. 1) represent two different rankings:

- (i) Fig. 1a compares success rates based on the ratio of observed enantioseparation to number of compounds successfully eluted in the present conditions (see above experimental conditions). Any separation factor strictly superior to 1 was considered a

“success” regardless the resolution, because we wanted to compare enantioselective capabilities understanding that a limited resolution could be further optimized by changing the operating conditions. As shown, the ranking is not simply related to the presence of chlorine substituents or type of polysaccharide, as the different chlorine substitutions, and coating vs. bonding also matter. The difference between Lux Amylose-2 and RegisPack CLA1 also suggests significant deviations in the manufacturing procedure for columns of different brand made with the same CSP chemistry. It must be pointed out that the difference here between best and worst performing phases is rather small, as all of these phases perform relatively well.

- (ii) Fig. 1b presents a different ranking based on the average separation factors observed for the “successful” cases defined above. Thus the classification is rather based on strong enantioseparation capabilities, even if they apply to a small proportion of the set of test compounds. Contrary to the previous figure, columns group closely based on their specific CSP. As already observed when comparing non-chlorinated CSP (part III of this series of papers [23]), it seems that amylose-based phases provide generally larger average separation factors than cellulose-based phases, with only a little intermixing between the two types of columns. This provides a complementary view to the preceding one as some phases that provided “low” success rates can however provide high average separation factors, and *vice-versa*.

3.1.2. Based on specificity

The four non-chlorinated phases were selected from the same manufacturers of the chosen chlorinated phases for better comparisons. Thus Lux Cellulose-1 can be compared to Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4 (coated cellulosic phases from Phenomenex); RegisPack can be compared to RegisPack CLA-1 (coated amylosic phases from Regis Technologies); Chiralpak IB can be compared to Chiralpak IC (immobilized cellulosic phases from Daicel), and Chiralpak IA can be compared to Chiralpak ID and Chiralpak IE (immobilized amylosic phases from Daicel).

Our purpose in this section is to reveal possible complementary separation behaviours between chlorinated and non-chlorinated columns from the same manufacturers. Fig. 2 presents Venn diagrams to illustrate the proportions of compounds that can be separated specifically on a chlorinated phase as compared to its non-chlorinated counterpart. For this figure, only the racemates that could be eluted on the two columns compared were retained, thus the overall success rate for one column may be different from that observed on Fig. 1.

For the six couples of columns selected, the overlapping between the chlorinated and non-chlorinated column is always in the range of 40%. The specificity of the popular non-chlorinated phases ranges from 10 to 30%, while the specificity of the chlorinated columns ranges from 9 to 20%. Thus it appears that the contribution of chlorinated phases for a screening strategy should not be ignored.

3.1.3. Based on clustering

A second type of classification based on cluster analysis (AHC) was achieved to quickly gather the CSPs depending on their ability to retain and discriminate the enantiomers.

The first AHC (Fig. 3a) is based on the logarithms of *retention factors* of the *achiral test compounds*. Only those compounds that could be successfully eluted on all columns were retained in this calculation, thus 170 compounds (out of the initial 230) were used. The data were normalized (centred and reduced) to ensure that any difference in phase ratio issuing from different packing procedures would not affect the result. Thus the observed clustering is rather

resulting from comparable elution order regardless of the absolute retention on CSP.

The retention capabilities of chlorinated phases are particularly well discriminated from those of their non-chlorinated counterparts. Indeed, the non-chlorinated CSP are clustered at the top of the dendrogram, while all chlorinated phases are clustered at the bottom. This is a first indication that the introduction of an electron-withdrawing substituent in the aromatic moieties does strongly affect the chromatographic behaviour. Besides, the amylose and cellulose phases are separated in both groups.

However, a closer look at the links in the dendrogram reveals that, within the above discrimination, the phases are rather clustered depending on the manufacturer. Indeed, the three cellulose phases provided by Phenomenex (Sepapak-5, Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4) are clustered. The amylose phase provided by Phenomenex (Lux Amylose-2) is closer to RegisPack CLA-1 from Regis Technologies that is based on the same chiral selector (tris-(5-chloro-2-methylphenyl)carbamate)). However, all three chlorinated immobilized phases (Chiralpak IC, ID and IE) provided by Daicel are clustered together although the former is based on cellulose while the other two are based on amylose. In the previous part of this work [23], we had similarly pointed out that the immobilized phases Chiralpak IA and IB had little dissimilarity as far as retention capabilities were concerned. There are different possibilities to immobilize the polysaccharide on the silica support: cross-linking of the polymer or covalent bonding are both feasible. Covalent bonding may involve some surface modification of the silica prior to covalent attachment of the chiral selector, while cross-linking implies that pendant hydroxyl groups may remain on the polysaccharide, because unmodified hydroxyl groups are necessary for cross-linking. Whatever the means selected, it is clear that the overall chemistry of the stationary phase is producing somewhat similar retention capabilities for the immobilized phases comparing to the coated phases.

The second AHC (Fig. 3b) is based on the logarithms of *separation factors* ($\log \alpha$) of the *chiral test compounds*. Again we retain only those compounds that could be successfully eluted on most columns. For the reasons detailed in our previous paper [23], we decided to fill in the gaps of the data table with zero values, which allowed 124 compounds (out of the initial 130) to be retained for the calculation. The data were again normalized, thus two columns should be grouped in the same cluster depending on their ability to discriminate (or not) the same racemates, rather than to provide identical separation factors.

The clustering is much less obvious with rather high dissimilarity levels observed among all phases than that shown in the previous figure. It is not unexpected since the chiral selectors in this set of columns vary with only a few redundancies among them. Nevertheless, some discrimination appears between amylose-based CSP (clustered in the centre part of the dendrogram) and the cellulose-based CSP (clustered at the top and bottom of the dendrogram).

The cellulose-based Chiralpak IB and Lux Cellulose-1 on one hand, Chiralpak IC and Sepapak-5 on the other hand, cluster together, in accordance with their identical ligands. However, the dissimilarity level is rather high, suggesting that the immobilization process does affect enantioselectivity. Also the amylose-based RegisPack CLA-1 markedly differs from its homologous CSP Lux Amylose-2. The fact that these phases were provided by different manufacturers (Daicel and Phenomenex on one hand, Regis Technologies and Phenomenex on the other hand) is also an important factor. Manufacture process could vary between different vendors; silica support, possible pre-treatment of this support, poly-dispersion of the polysaccharide, coating process or the change in three-dimensional structure issuing from the coating process could all affect the overall column performance. This point

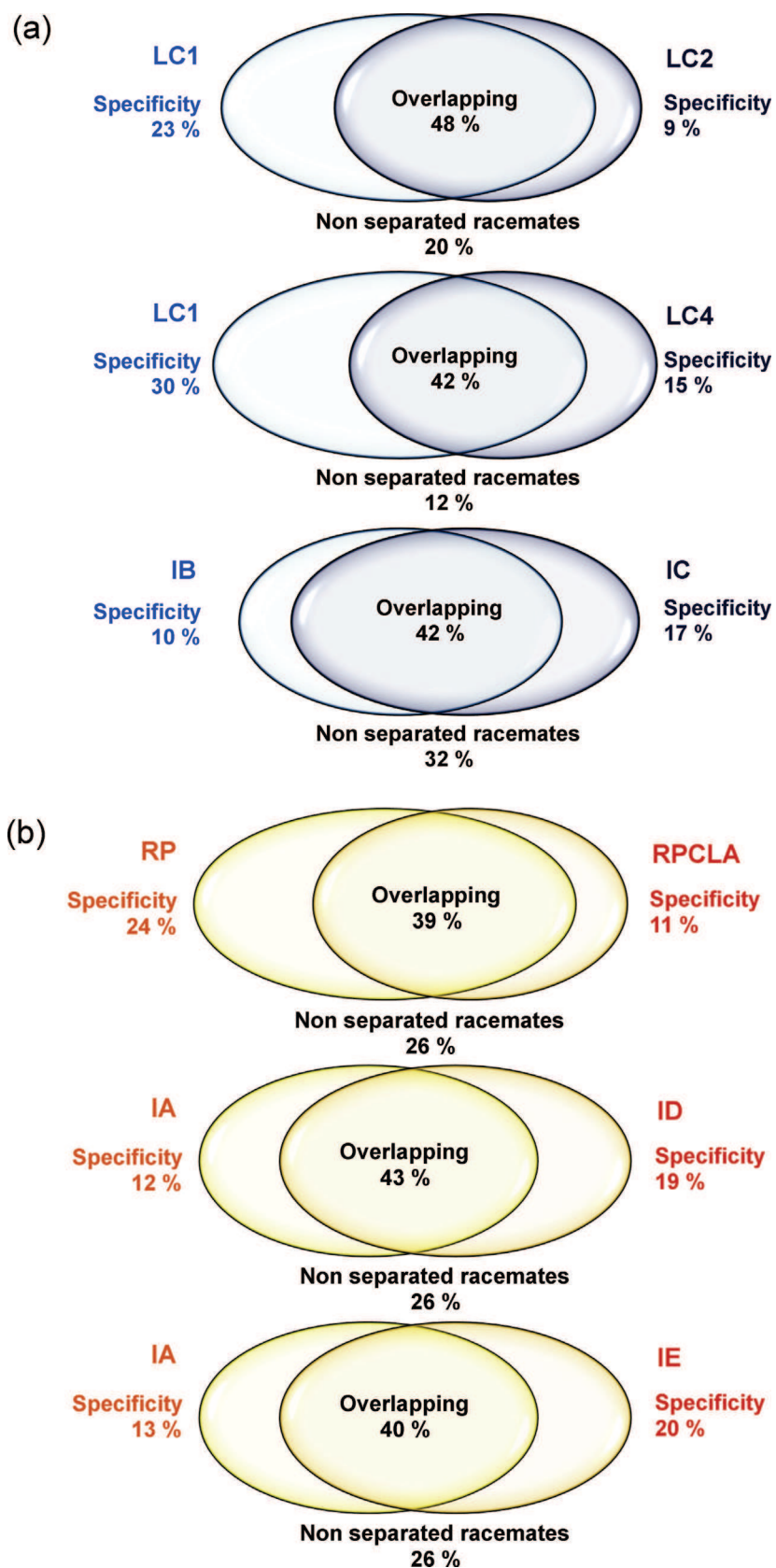


Fig. 2. Specificity of chlorinated phases vs. non-chlorinated phases. (a) Cellulosic phases, (b) amylosic phases.

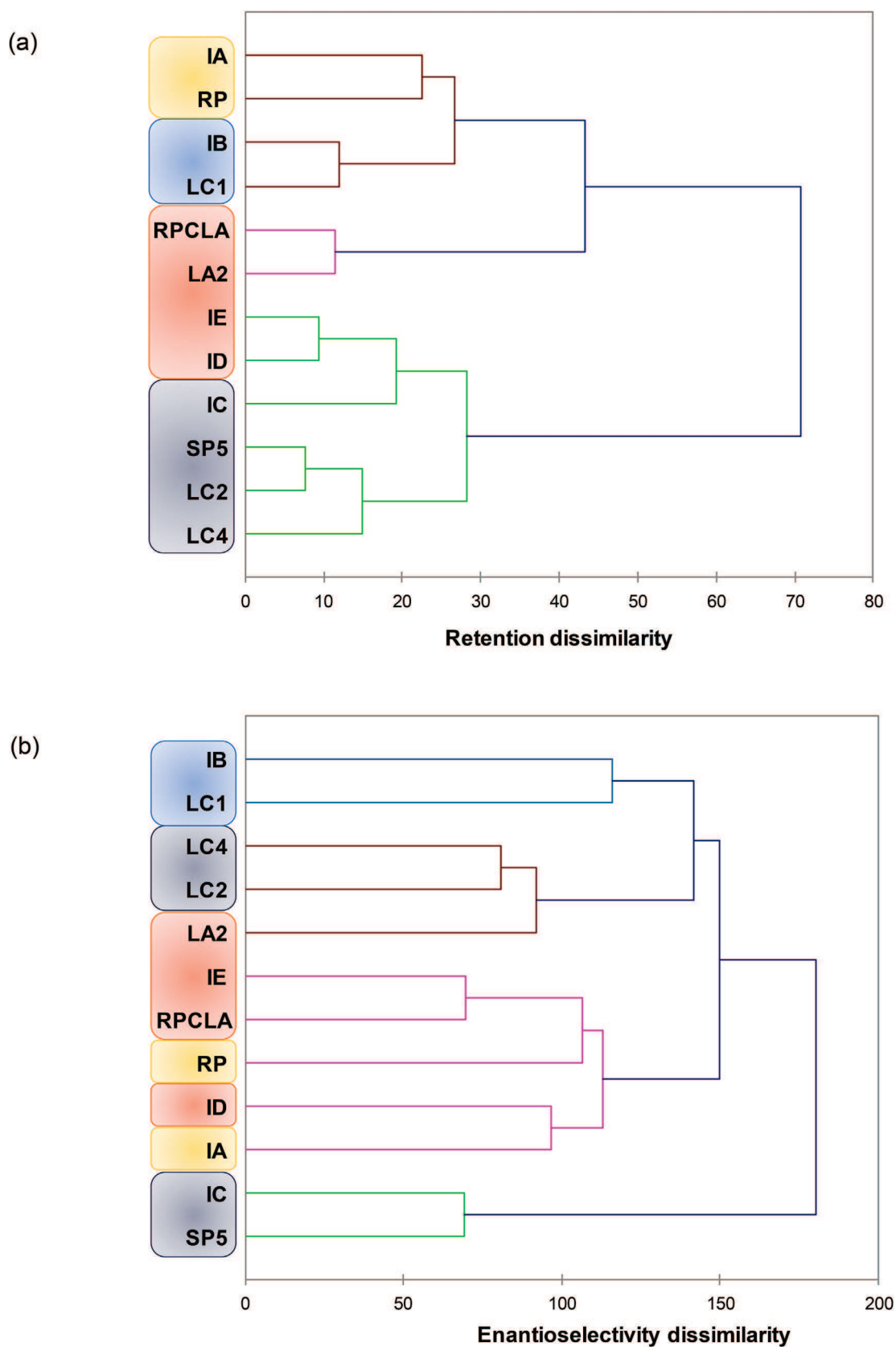


Fig. 3. Agglomerative hierarchical clustering based on (a) the logarithm of normalized retention factors ($\log k$) of 170 achiral compounds and (b) the normalized logarithm of separation factors ($\log \alpha$) of 124 racemates. Dissimilarity was measured as the Euclidean distance between the columns. The columns are identified in Table 1 and coloured according to chiral selector: cellulose or amylose, chlorinated or not. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

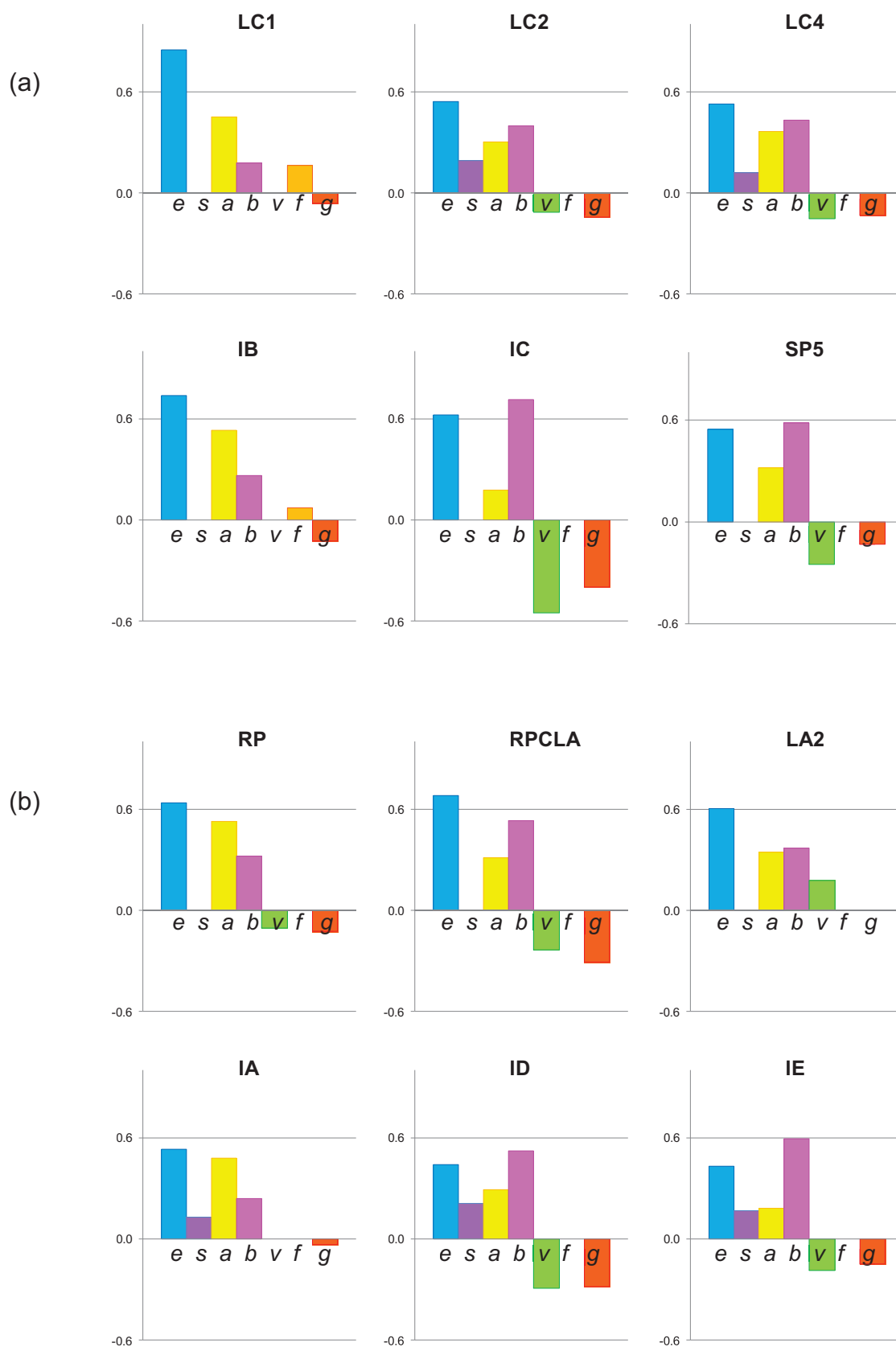


Fig. 4. The beta coefficients (*e*, *s*, *a*, *b*, *v*, *f* and *g*) issued from the multiple linear regression analysis on the 12 columns in Table 1. Each bar represents the contribution of a given interaction to retention (see text for details). (a) Cellulose CSP, (b) amylose CSP.

also appears in the clustering of three Phenomenex phases although two of them are based on cellulose (Lux Cellulose-2 and -4) while the third one is based on amylose (Lux Amylose-2). Naturally, this observation may just be coincidental.

Since these figures provide only an apparent ranking of similarities in success rate or average selectivity, other methods are needed for an in-depth understanding of the interactions between the solute and the CSP at a molecular level.

3.2. Chemometric strategies employed to describe retention and separation mechanisms

3.2.1. Retention properties characterized with quantitative structure–retention relationships

In our previous works, linear solvation energy relationships (LSER) based on a modified version of the solvation parameter model have been used to describe the intermolecular interactions and steric features [21,22] using the following equation:

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG \quad (1)$$

In this equation, capital letters represent the solute descriptors, related to particular structural features, while lower case letters represent the system constants, related to the complementary effect of the phases on these interactions. c is the model intercept term and is dominated by the phase ratio. E is the excess molar refraction (calculated from the refractive index of the molecule) and represents polarizability contributions from n and π electrons; S is the solute dipolarity/polarizability; A and B are the solute overall hydrogen–bond acidity and basicity; V is the McGowan characteristic volume in units of $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}/100$; F is the flexibility of the molecule, calculated as the fraction of rotatable bonds; G is the globularity, qualifying the compactness of the molecule.

The system constants (e, s, a, b, v, f, g), obtained through a multi-linear regression of the retention data for a certain number of solutes with known descriptors, reflect the magnitude of difference for that particular property between the mobile and stationary phases. Thus, if a particular coefficient is numerically large, then any solute having the complementary property will interact very strongly with either the mobile phase (if the coefficient is negative) or the stationary phase (if the coefficient is positive).

Thus retention properties were evaluated with Eq. (1) for all columns. All results for the 12 columns in Table 1 are presented in Table 2 (the model system constants) and Fig. 4 (the beta coefficients to compare the relative contributions of each term to the model).

A general overview of Fig. 4 indicates that the most significant and consistent difference between chlorinated phases and their non-halogenated counterparts appears in the reversal of the relative strengths of hydrogen–bonding interactions. Indeed, on chlorinated phases the retention of acidic compounds is reduced (a term) and the retention of basic compounds is increased (b term) compared to non-halogenated phases. Different interaction capabilities are also reflected in the increased s term related to dipole–dipole interactions and somewhat reduced e term related to π – π interactions, particularly on cellulose phases. These features must be related to the electronic effects of the chlorine atoms, as will be further detailed below.

The reversal of the relative strength of hydrogen bonding interactions can be simply explained by the observation of electronic effects. The chlorine atoms on the aromatic ligand have a significant electron-withdrawing effect. This effect extends beyond the aromatic ring, all the way to the carbamate function: the basicity of the $\text{C}=\text{O}$ group is decreased and the acidity of the NH group is increased as compared to phenyl ring with only methyl groups.

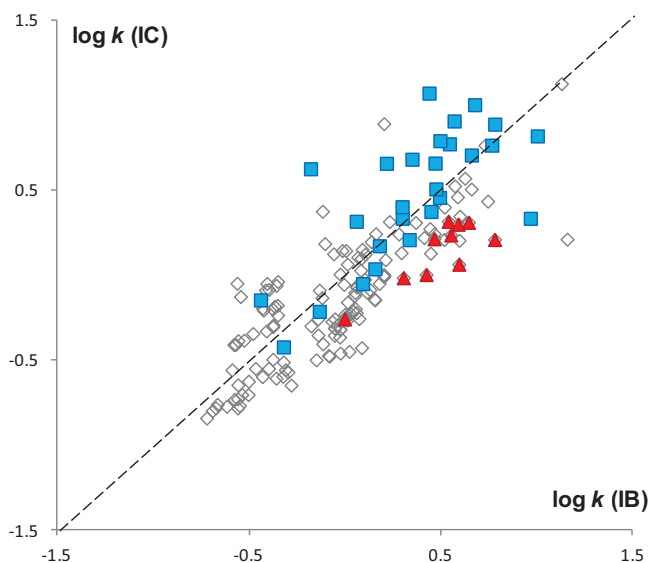


Fig. 5. Comparison of retention for the achiral compounds on a chlorinated (IC) and a non-chlorinated (IB) cellulosic immobilized phases. Blue squares are basic compounds, red triangles are acidic compounds and the open diamonds are neutral species. The interrupted line indicates iso-elution. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

As a result, basic compounds show stronger retention on the chlorinated phases than on the non-chlorinated ones, while acidic compounds are less retained. An example is provided with Fig. 5 where the retention factors measured on Chiralpak IB and IC are compared. This is in accordance with Chankvetadze's studies based on ^1H NMR and IR spectral data. He assumed that the presence of chlorine substituents on the phenyl moieties increased the acidity of NH groups of the carbamate function [11].

Chlorine atoms exert an electron-withdrawing effect on the phenyl ring while methyl groups are electron-donating. As a result, π – π interactions are seen to decrease when methyl groups are replaced with chlorine substituents and the e term decreases. This should however not be over-interpreted because the s term, on the contrary, is seen to increase. However, the e and s terms are somewhat correlated as they both partly encode interactions related to polarizability of the analyte. Besides, the reason why this change should have less effect on amylose-based phases than on cellulose-based phases is unclear.

Another significant change is related to the effect of large molecular size that is detrimental to retention on all chlorinated CSP (apart from Lux Amylose-2) while it had no or little effect on the non-chlorinated CSP. This feature is most likely related to different three-dimensional structures of the polysaccharides and size of the cavities, which will be further discussed in the following sections.

3.2.2. Separation properties characterized with discriminant analyses

We have described in previous works that the above descriptors can also be used to describe enantioseparation processes with the help of discriminant analysis (DA). We have thus proposed 4 classes defined as follows [23]:

- Class 1 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).
- Class 2 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted after their predicted retention, based on Eq. (1).
- Class 3 comprises racemates that were “not separated” ($\alpha = 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).

Table 2

The system constants obtained from the LSER analysis (Eq. (1)) for the CSP in Table 1.

Column	System constants								Statistics			
	c	e	s	a	b	ν	f	G	n	R^2_{adj}	SE	F
OD	−0.54 0.05	0.69 0.02		0.54 0.03	0.18 0.04			−0.18 0.03	200	0.88	0.14	372
IB	−1.05 0.04	0.64 0.02		0.75 0.03	0.43 0.04		0.02 0.01	−0.09 0.02	186	0.91	0.14	373
LC2	−0.67 0.14	0.52 0.03	0.23 0.05	0.44 0.04	0.61 0.05	−0.12 0.05		−0.20 0.06	171	0.90	0.14	264
LC4	−0.71 0.17	0.53 0.04	0.14 0.06	0.52 0.05	0.69 0.07	−0.16 0.06		−0.20 0.07	174	0.86	0.18	180
SP5	−0.43 0.20	0.63 0.04		0.55 0.06	1.12 0.07	−0.31 0.07		−0.22 0.09	173	0.84	0.22	186
IC	0.45 0.23	0.59 0.04		0.24 0.05	0.99 0.06	−0.61 0.09		−0.56 0.10	180	0.81	0.20	149
RP	−0.75 0.14	0.66 0.03		0.74 0.04	0.44 0.05	−0.11 0.05		−0.18 0.06	180	0.87	0.17	243
IA	−0.89 0.08	0.50 0.04	0.15 0.06	0.65 0.05	0.33 0.06			−0.05 0.04	180	0.84	0.18	182
LA2	−1.31 0.06	0.62 0.03		0.48 0.05	0.57 0.05	0.19 0.04			180	0.84	0.19	230
RPCLA	−0.15 0.17	0.63 0.03		0.42 0.04	0.70 0.05	−0.26 0.06		−0.47 0.07	174	0.89	0.14	278
ID	−0.30 0.25	0.45 0.05	0.25 0.06	0.44 0.05	0.85 0.07	−0.36 0.09		−0.41 0.10	179	0.85	0.18	171
IE	−0.74 0.17	0.47 0.04	0.23 0.06	0.28 0.05	1.06 0.07	−0.22 0.06		−0.24 0.07	181	0.88	0.18	212

n is the number of solutes considered in the regression. R^2_{adj} is the adjusted correlation coefficient. SE is the standard error in the estimate, F is Fischer's statistic.

- Class 4 comprises racemates that were “not separated” ($\alpha = 1$) but eluted after their predicted retention, based on Eq. (1).

Then four different 2-class DA can be computed, which are much easier to interpret than a 4-class DA:

- Class 1 vs. Class 2 and Class 3 vs. Class 4 indicate the features that are responsible for a compound to elute earlier or later than predicted thus may indicate the reasons for heterogeneous behaviours (Fig. 6).
- Class 1 vs. Class 3 and Class 2 vs. Class 4 indicate the features that are common to successfully resolved racemates among early eluting or lately eluting compounds (Fig. 7).

To compare less and more retained racemates (classes 1/2 and 3/4 in Fig. 6), the descriptor's bars that are pointed on the left-hand side (negative values) indicate structural features that are common to less retained racemates while those pointed on the right-hand side (positive values) indicate structural features that are common to more retained racemates. To compare separated and non separated racemates (classes 1/3 and 2/4 in Fig. 7) the descriptor's bars that are pointed on the left-hand side (negative values) indicate structural features that favour co-elution while those pointed on the right-hand side (positive values) indicate structural features that favour enantioseparation.

Consistently with our previous observations [23], early eluting enantiomers are clearly discriminated from late eluting ones (Fig. 6) following the same pattern regardless of column, apart from rare exceptions. Indeed, for most CSP it appears that lately eluting racemates are rather small and spherical molecules as the descriptor related to molecular volume (V) is pointing to the left while the descriptor related to globularity (G) is pointing to the right. The cellulose-based Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4 behave differently for non-separated racemates (classes 3/4) with high flexibility being the most significant feature of lately eluting racemates. In all cases, other structural features that relate to interaction capabilities (E , S , A and B) all point to the left, thus to early eluting racemates. These observations suggest that the early eluting racemates may

be separated due to enhanced interaction capabilities; the lately eluting racemates with fewer capabilities for interactions may be compensated by the superior structural features allowing them to enter chiral cavities (small volume) and possibly better fit to the walls of these cavities (sphericity).

Again as was already observed for non-chlorinated phases [22,23], non-separated species all have one feature in common: their high flexibility. Indeed, it can be observed on Fig. 7 that the descriptor bar related to flexibility is always pointing to the left (negative contribution), indicating that the racemates that are not separated are generally more flexible than those that were successfully separated. Other features vary for each column between early eluting and lately eluting racemates (classes 1/3 compared to classes 2/4). A great variety of patterns is observed among the different columns. In our previous works, several columns were available with the same chemistry but provided by different manufacturers thus it was possible to draw general tendencies for each type of CSP. This is largely attributed to the fact that most of the columns selected in this study differ in more than one aspect, thus it is difficult to attribute the variations observed to a particular chiral selector. Nonetheless, some specific differences are discussed below.

3.3. Detailed comparison of stationary phase chemistry

3.3.1. Cellulose chloromethylphenylcarbamate phases

Both Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4 are cellulose chiral columns in which the chiral selector is coated on the same silica support. They differ by the position of the substituents on the phenyl ring as Lux Cellulose-2 has a 3-chloro-4-methyl-phenylcarbamate ligand, while Lux Cellulose-4 has a 4-chloro-3-methyl-phenylcarbamate ligand.

The potential applications of the tris-(3-chloro-4-methyl-phenylcarbamate) of cellulose for a large spectrum of racemates have been reported in a number of articles [13,24,25], i.e. N -protected amino acids, barbiturates, β -blockers, imidazole derivatives or piracetam derivatives. They were first evaluated under NPLC, RPLC and POSC [15,16] but their use in SFC also ensures broad enantio-recognition abilities [17,18].

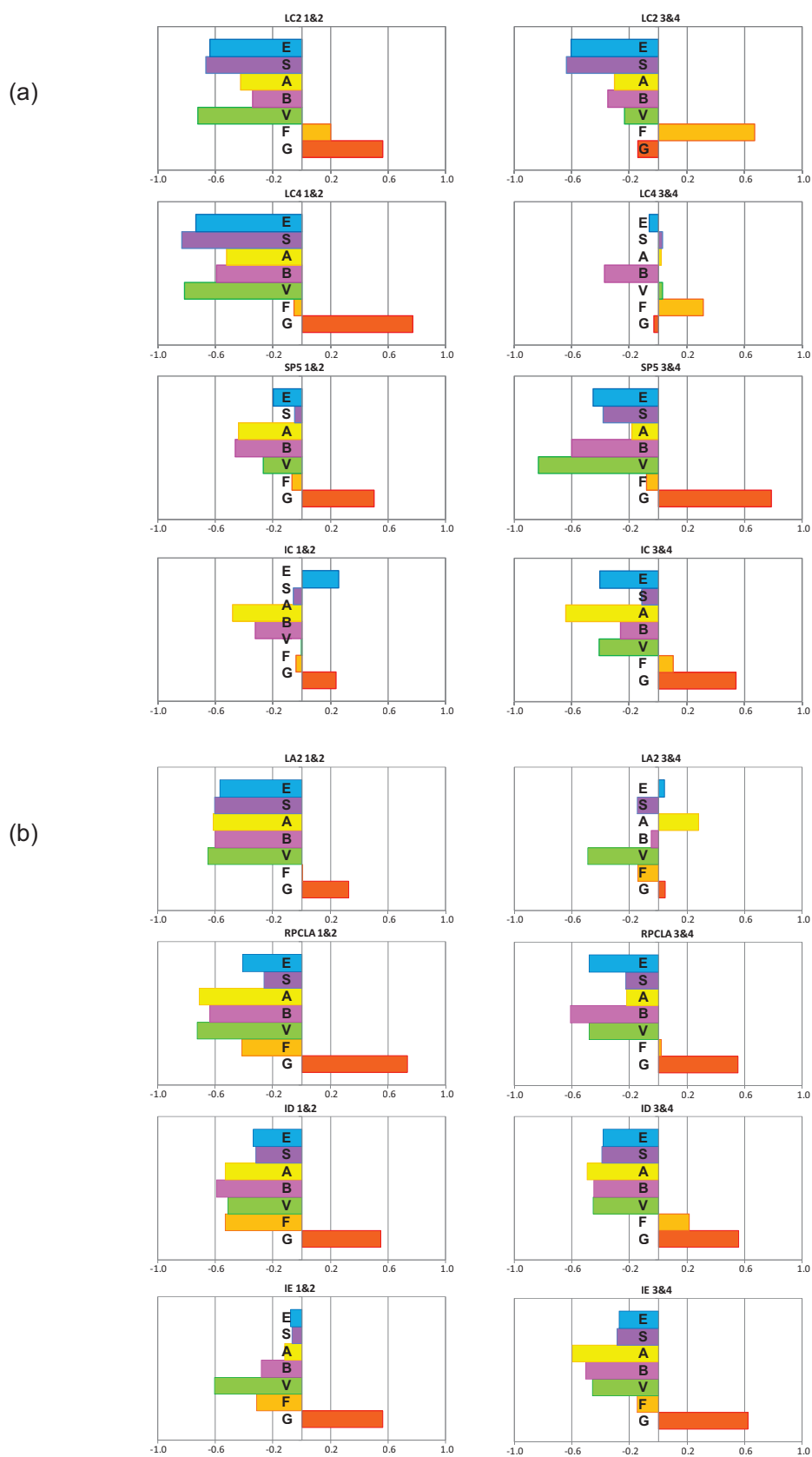


Fig. 6. Discriminant analyses between early eluting and late eluting racemates for the 12 columns in Table 1 using the seven molecular descriptors of the modified solvation parameter model as variables. Negative features are common to early eluting racemates (Class 1 and Class 3), positive features are common to late eluting racemates (Class 2 and Class 4). (a) Cellulose CSP, (b) amylose CSP.

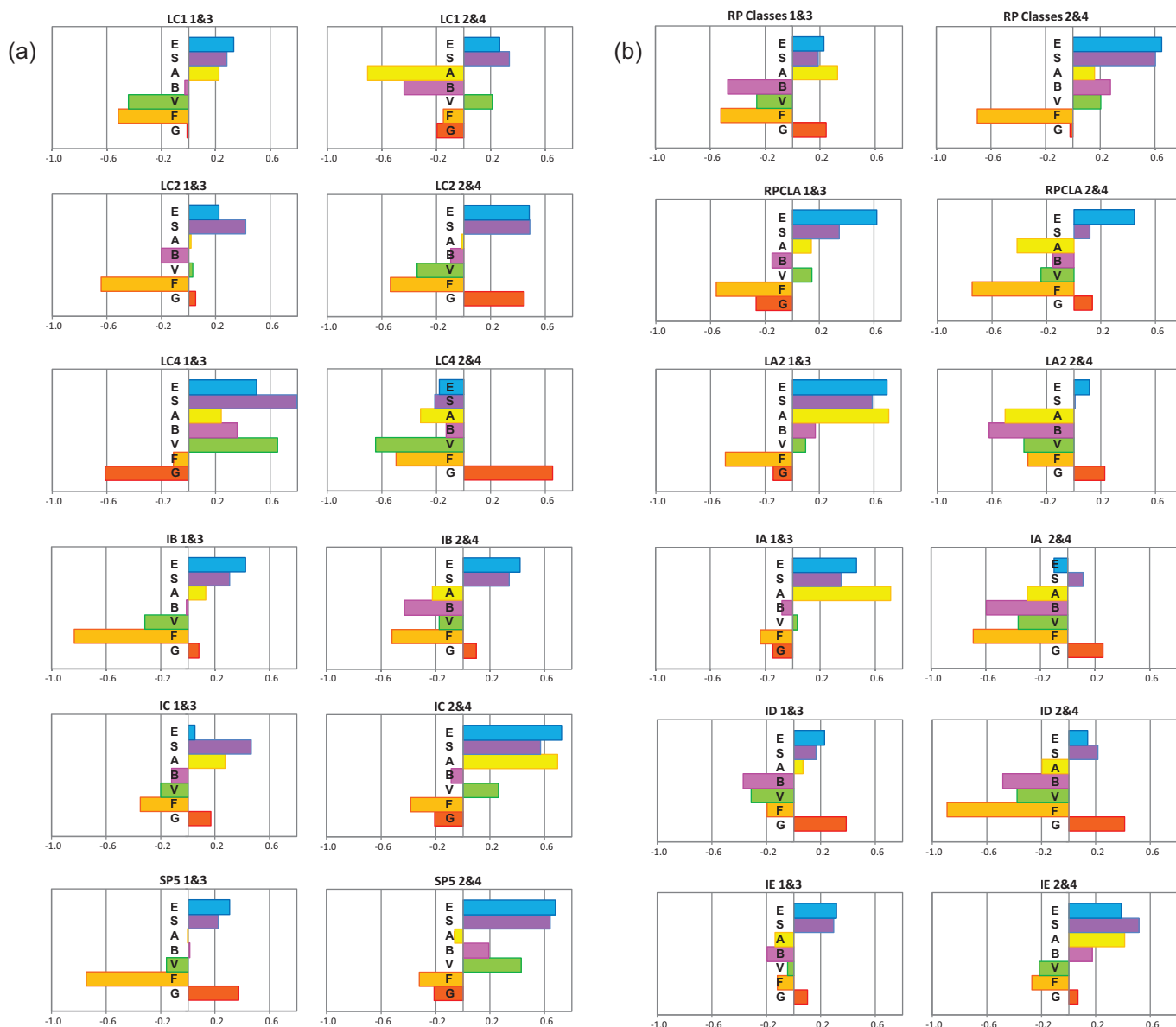


Fig. 7. Discriminant analyses between separated and non separated racemates for the 12 columns in Table 1 using the seven molecular descriptors of the modified solvation parameter model as variables. Negative features are common to non separated racemates (Class 3 and Class 4), positive features are common to separated racemates (Class 1 and Class 2). (a) Cellulose CSP, (b) amylose CSP.

Retention of achiral compounds on these two columns is highly similar (Fig. 4a) with the contribution of strong π – π interactions (e term), induced dipole–dipole interactions (s term) and hydrogen binding sites (a - and b -terms). Negative contributions of large molecular volume and sphericity (v and g) indicate that the steric constraints are also similar with these phases. Besides, observation of the retention factors on both columns provides a high correlation factor ($R^2_{k\text{-}plot} = 0.93$). However, all achiral and chiral compounds are slightly more retained on Lux Cellulose-2 than on Lux Cellulose-4, suggesting that phase ratio was different between the two columns, with a larger amount of stationary phase in the Lux Cellulose-2 column. This might be a possible reason for the larger separation factors observed on average on Lux Cellulose-2, as appears on Fig. 1b.

With regards to the number of successful enantioseparations, an overlap of 42% was observed between Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4, while the specificity was 12 and 9% for LC2 and Lux Cellulose-4, respectively. The observation of discriminant

analyses in Fig. 7a indicates that the features that contribute to successful enantioseparation in these two columns are significantly different.

As an example, the effects of size and shape can be illustrated with mephobarbital (Fig. 8a) and chlormezanone (Fig. 8b).

On Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4, mephobarbital enantiomers always elute before the predicted retention time, thus should belong to classes 1/3. Mephobarbital is a small and rather spherical molecule. It is also rather rigid, which should be a favourable feature to enantioseparation on all columns. Based on the DA in Fig. 7a for classes 1/3:

- Lux Cellulose-1 is favourable to small molecules because the descriptor for molecular volume (V) points to the left hand-side of the figure, indicating that large molecules are not favoured. The effect of globularity is not significant. Indeed, on Fig. 8a the enantioseparation of mephobarbital enantiomers can be observed on Lux Cellulose-1.

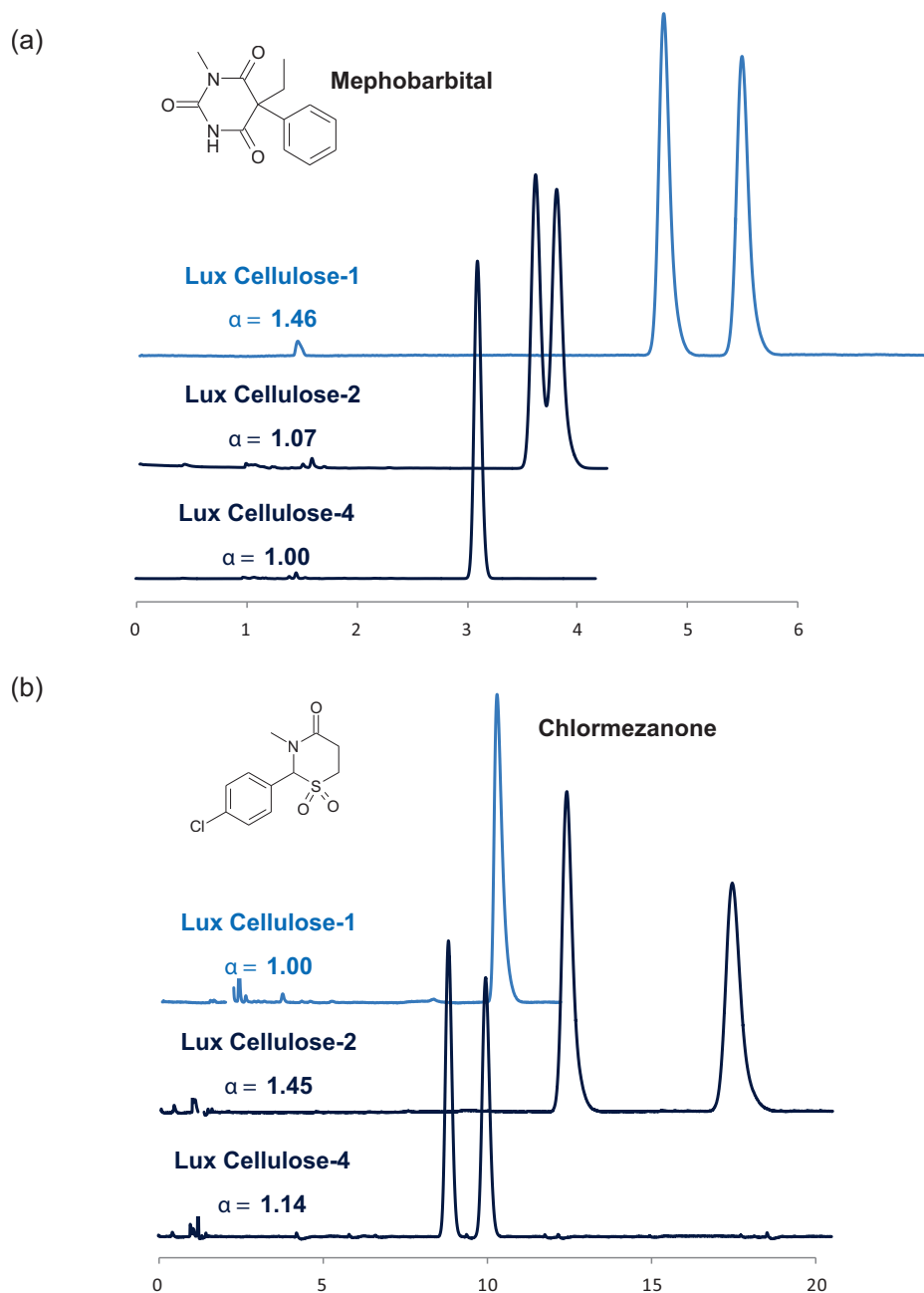


Fig. 8. Separation of (a) mephobarbital and (b) chlormezanone enantiomers on LC1, LC2 and LC4. See text for details.

- Lux Cellulose-2 is not sensitive to volume and shape as both the *V* and *G* descriptor have near zero contributions. Because the molecule is rigid, and also has other favourable features (*E* and *S* contributions), some separation is observed on Lux Cellulose-2 (Fig. 8a).
- On Lux Cellulose-4, the *V* descriptor pointing to the right indicates that large molecules are favoured, while the large *G* contribution pointing to the left indicates that spherical molecules are not favoured. As a result, the small and globular mephobarbital enantiomers are clearly not favoured on this column and Fig. 8a shows no resolution on Lux Cellulose-4.

Chlormezanone is also a small, rather spherical and rigid molecule. However, on Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4 it is eluted after the predicted retention thus should

belong to classes 2/4. In this case, the effects of volume and shape are reversed compared to the previous case:

- On Lux Cellulose-1, large and flat molecules are favoured (*V* is pointing to the right and *G* is pointing to the left) thus the separation is not favoured and a co-elution of the enantiomers is observed (Fig. 8b).
- On Lux Cellulose-2 and Lux Cellulose-4, small and flat molecules are favoured (*V* is pointing to the left and *G* is pointing to the right) thus baseline resolution is observed on both columns. In the case of Lux Cellulose-4, steric constraints (size and shape) are the only favourable features as all others contributions (π - π interactions, dipole-dipole, hydrogen bonding) are pointing to the left. As a result, the separation factor is smaller on Lux Cellulose-4 ($\alpha = 1.14$) than on Lux Cellulose-2 ($\alpha = 1.45$)

where other interactions (π – π interactions reflected in the positive E term, dipole–dipole reflected in the positive S term) are favourable to the enantioseparation (Fig. 8b).

3.3.2. Amylose chloromethylphenylcarbamate phases

Two columns were based on the same chiral selector of amylose tris-(5-chloro-2-methylphenylcarbamate) coated on silica: Lux Amylose-2 provided by Phenomenex and RegisPack CLA-1 provided by Regis Technologies. On cellulose derivatives, the 2-position is not privileged to achieve high performance due to a disordered secondary structure [11]. On amylose tris-(5-chloro-2-methylphenylcarbamate), high performance lies in a perfect balance between adsorptive sites (contributing to intermolecular hydrogen bonding) and the high-degree structuring of the modified polymer (amylose-based CSP), through intramolecular hydrogen bonding [12].

The two columns had somewhat different retention patterns (Fig. 4b). On Lux Amylose-2: a lower contribution of hydrogen bonding with basic compounds (b term), no significant contribution of sphericity (g term), and most noticeably, a positive contribution of molecular volume (ν term); on RegisPack CLA-1: a higher b term, negative sphericity (g term), and negative molecular volume (ν term). The two columns also provided similar separation factors as appeared in Fig. 9a. Slightly larger selectivity was measured on the RegisPack CLA-1 phase as shown in Fig. 1b. The compounds that deviate significantly from the iso-separation line did not group per any particular structural feature or other characteristic. Besides, the separation patterns on Fig. 7b are rather similar, with again the most significant difference appearing in the A -term.

As we reported in our previous papers, columns with the same chiral selector provided by different manufacturers often differed in possibly two aspects: hydrogen bonding and steric constraints. The former may issue in part from different silica supports and different treatments applied prior to the polymer coating. This is supported by constant deviation observed for basic compounds. Different steric constraints may issue from different coating procedures (particularly the choice of solvent) that impact the supramolecular structure of the polymer. Judging from the retention models, it is probable that chiral cavities are larger or easier to reach on LA2, as large and spherical molecules are not excluded. In this case, the larger contributions of hydrogen-bonding to enantioseparation (Fig. 7b) would make sense as the carbamate functions may be more readily accessed on this column.

3.3.3. Cellulose dichlorophenylcarbamate phases

Two other columns in our set were available with the same polymer (cellulose) and ligand (3,5-dichlorophenylcarbamate), only in this case, one of them was a commercial immobilized phase provided by Daicel (Chiralpak IC) while the other one was a prototype coated phase provided by Phenomenex (Sepapak-5).

The coated Sepapak-5 column was of interest because such columns have long been said to be unstable [26,27]: indeed, the cellulose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate) is highly soluble in most solvents, thus commercial coated phases with this chiral selector were unavailable. The introduction of the immobilized Chiralpak IC column was thus a significant innovation in providing this chiral selector in a non-soluble form. It must be pointed out however that, whatever the immobilization process, it implies that some pendant hydroxyl groups remain on the polysaccharide prior to bonding or cross-linking. As a result, the modified polysaccharide is not tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate) as the number of ligands bonded to each glucose unit is less than three. This is bound to create additional differences between the coated and immobilized columns, and possibly lower enantioselectivity capabilities.

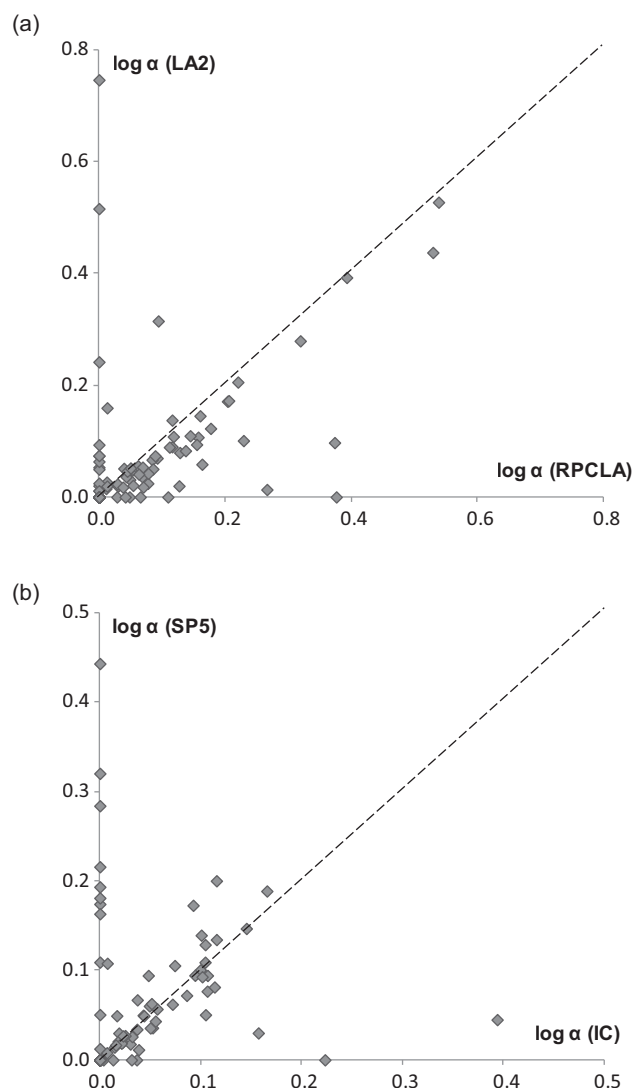


Fig. 9. Comparison of separation factors for the racemates analyzed on two phases with the same chiral selector (a) two coated phases from different manufacturers (LA2 vs. RPCLA) or (b) a coated (SP5) and an immobilized (IC) cellulosic phase. The interrupted line indicates iso-separation.

We initially investigated the stability of the coated phase in typical SFC operating conditions:

- The Sepapak-5 column was flushed a few hours with increasing proportions of methanol, up to 40%.
- It was then flushed with different co-solvents (ethanol, isopropanol and acetonitrile).
- It was finally operated under different temperature conditions (from 10 to 40 °C).

Before and after each of these steps, nine testing racemates that provided good resolution and a wide range of retention were injected under standard testing conditions. No marked differences could be observed, only small variations in retention times that are not more than the usual variations observed on other coated phases. Thus we concluded that the stability of the column under these usual SFC operating conditions is comparable to that of other coated phases.

In the comparison of the coated and immobilized phases, the overall retention models (Fig. 4a) are rather similar with differences

only in the intensity, not the sign of the different terms contributing to retention.

For enantioseparation, we had already pointed out above that the two columns are rather similar in their retention and enantioselectivity capabilities (Fig. 3). It is also visible from Fig. 9b where the separation factors measured on both columns are compared. It appears that a large proportion of compounds is positioned close to the interrupted line indicating identical separation factors, while only a small proportion of compounds exhibits different behaviour with separation observed on one column and co-elution on the other one. No particular trend could be drawn for these “anomalous” compounds. The discriminant analyses in Fig. 7a indicates that the most significant difference between the two columns seems to be in the *A*-term. The retention of acidic species is significantly longer on the immobilized phase as compared to the coated phase. Different reasons may explain this difference. The columns are probably based on different silica supports. More importantly, the immobilization process in the Chiralpak IC column may induce the presence of other polar groups in the CSP if the chiral selector is bonded on the silica, or some pendant hydroxyl groups from the polysaccharide if the immobilization process involves cross-linking of the polymer through unmodified hydroxyl groups. This effect is particularly strong for the lately eluting racemates (classes 2/4). Other features are seen to vary to a much smaller extent.

3.3.4. Immobilized phases

Apart from the solvent compatibility, immobilized CSPs have been introduced to enhance the application scope of polysaccharide-based CSPs and offer new enantioselectivity profiles. Indeed, the immobilization process affects the higher order structure of the modified polymer and may afford new chiral recognition. In addition, the use of markedly different solvents (other than the usual alcohols–methanol, ethanol and isopropanol) may also affect the enantioselectivity process.

As pointed out above, the coated cellulose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate), amylose tris-(3-chlorophenylcarbamate) and amylose tris-(3,5-dichlorophenylcarbamate) were not used because of their solubility in common organic solvents [26,28]. Various processes have thus been applied to achieve the immobilization of the polysaccharide derivatives [29,30] on silica gel matrix and afford a good performance. Under current patent for immobilized CSP, each of the phases studied here is commercialized and based on a proprietary technology from Daicel Chemical Industries Ltd. Their enantioselective performances in a screening have been fully exploited with other immobilized CSPs, such as Chiralpak IA and IB [27]. De Klerck et al. demonstrated that the only use of immobilized CSPs provides equivalent cumulative success rate compared to coated ones in a screening procedure [31]. Industrial practice most often associates immobilized-type CSP (chlorinated or not) as a secondary screening strategy under non-standard mobile phase conditions. We have already shown above (Fig. 2) that the specificity brought by the chlorinated immobilized phases was quite good (between 17 and 20%), which is a further argument to support their introduction in a screening strategy.

Both cellulose-based phases, Chiralpak IB and Chiralpak IC, possess 3,5-disubstituted-phenylcarbamate ligands, while Chiralpak IB is dimethyl and Chiralpak IC is dichloro. Their retention properties can be compared in Fig. 4a. As pointed out above, the presence of chlorine atoms is exerting an effect on the carbamate function, but also on the π electron density of the phenyl moieties, as the *e* term is seen to decrease when the phenyl is substituted with two electron-withdrawing chlorine atoms. The separation patterns in Fig. 7a indicates that the change in electron density of the phenyl ring is essentially visible in the racemates in classes 1/3 while

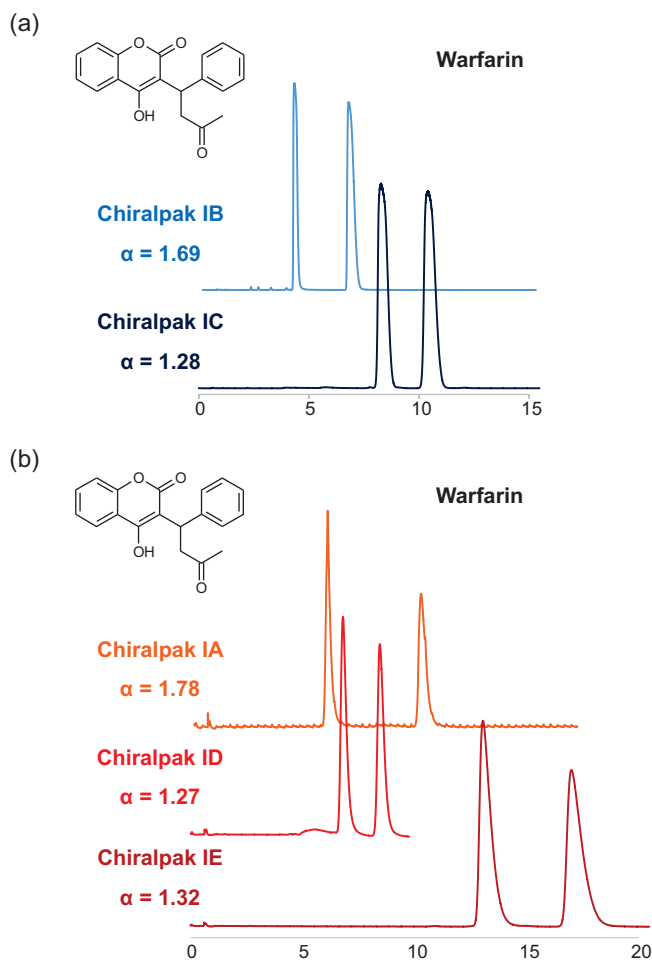


Fig. 10. Separation of warfarin enantiomers on the immobilized phases (a) cellulosic phases IB & IC, (b) amylose phases IA, ID and IE. See text for details.

the changes in hydrogen-bonding properties are rather visible in classes 2/4.

Numerous articles indicate that Chiralpak IC as a complementary CSP to Chiralpak IA and IB, the first commercialized immobilized CSPs, due to the combined effect of amylose and cellulose backbone as well as the π -donor and π -acceptor substituents in the aromatic ring [27,32].

Similarly, both amylose-based phases, Chiralpak IA and Chiralpak IE, possess 3,5-disubstituted-phenylcarbamate ligands while Chiralpak IA is dimethyl and Chiralpak IE is dichloro. Chiralpak ID is also a chlorinated amylose-based CSP, where the ligand is monosubstituted with a chlorine atom in the 3-position. The retention properties of the three columns can be compared in Fig. 4b. In this case, the reduction in π electron density of the phenyl moieties when chlorine atoms are present is not as significant as with cellulosic phases. On the other hand, the separation patterns in Fig. 7b again evidence the significantly different contributions of hydrogen-bonding interactions (*A* and *B* terms).

It may be of interest to note that the separation patterns observed for Chiralpak IA and ID in classes 2/4 are essentially the same. This suggests that the contribution of one chlorine atom is of little consequence to lately eluting racemates. The latter were shown to be small and spherical molecules, possibly entering deeper in the CSP structure.

The separation of warfarin enantiomers in Fig. 10 can be used to illustrate our findings. Warfarin is a relatively large molecule, with high aromaticity (*E* value), some hydrogen-bonding capability

Table 3

Summary of observed retention and separation properties observed with QSRR and DA for the chlorinated phases.

Column	Notable retention properties	Notable enantioseparation properties
LC2	Retention of aromatics, bases and acids Some retention of dipoles	Flexibility is deleterious to separation Spherical molecules are favoured Dipole–dipole and π – π interactions are favourable to all
LC4	Some steric resistance towards large and spherical molecules	Flexibility is deleterious to separation Large and flat molecules are favoured Small and spherical molecules are favoured H-bonding, dipole–dipole and π – π interactions are essentially favourable to large and flat molecules
SP5	Retention of aromatics and bases Some retention of acids Steric resistance towards large and spherical molecules	Flexibility is deleterious to separation Large and flat molecules are favoured Small and spherical molecules are favoured Dipole–dipole and π – π interactions are favourable to all
IC		Flexibility is deleterious to separation Large and flat molecules are favoured Small and spherical molecules are favoured Proton donors are favoured Dipole–dipole and π – π interactions are favourable to all
LA2	Retention of aromatics, bases and acids Varied effects of size and shape	Flexibility is deleterious to separation Large and flat molecules are favoured Small and spherical molecules are favoured H-bonding, dipole–dipole and π – π interactions are essentially favourable to flat molecules
RPCLA		Flexibility is deleterious to separation Large and flat molecules are favoured Small and spherical molecules are favoured π – π interactions are favourable to all
ID	Retention of aromatics and bases Some retention of acids and dipoles	Flexibility is deleterious to separation Small and spherical molecules are favoured Dipole–dipole and π – π interactions are favourable to all
IE	Steric resistance towards large and spherical molecules	Flexibility is deleterious to separation Small and spherical molecules are favoured H-bonding is favourable to spherical molecules Dipole–dipole and π – π interactions are favourable to all

(*A* value related to a hydroxyl group); it is rather flat (low *G* value) and rigid (low *F* value). The separation of warfarin enantiomers is known to be an easy one as it is usually achieved on most chiral selectors, thanks to its particular rigidity. Indeed, among all columns we have tested so far, only one of them was unable to separate warfarin enantiomers. Nevertheless, the separation factors on different columns vary. On all five immobilized phases, warfarin eluted before the predicted retention (large and flat molecule, in accordance with Fig. 6) thus should belong to class 1.

As shown in Fig. 10, the separation decreases both on cellulosic and amylosic phases when moving from non-chlorinated to chlorinated phases (Chiralpak IB vs. IC on one hand; Chiralpak IA vs. ID and IE on the other hand). However, the reasons for this reduction in enantioselectivity may be different. On the Chiralpak IB column, the negative contribution of flexibility is very large (Fig. 7a), thus conversely rigidity is a very favourable feature inducing a large separation factor ($\alpha = 1.69$). On Chiralpak IC, this contribution is reduced, and also the favourable contribution of π – π interactions is reduced (*E* term) causing a decreased separation factor ($\alpha = 1.28$) (Fig. 10a). Comparing the separation patterns on Chiralpak IA, ID and IE (Fig. 7b), the reason for a decreased enantioseparation may be completely different: on Chiralpak IA, the separation is favoured by hydrogen bonding (large positive *A* term) causing a large separation factor ($\alpha = 1.78$). On Chiralpak ID and IE, this *A* term is greatly reduced. Also the effect of shape is reversed, as spherical molecules are favoured on Chiralpak ID and IE (positive *G* term), while flat molecules like warfarin are favoured on Chiralpak IA (negative *G* term). As a result of the changes in *A* and *G* contributions, the separation factors on Chiralpak ID and IE are smaller ($\alpha = 1.27$ and 1.32 , respectively) (Fig. 10b).

This last example is perhaps the best illustration that identical observations (reduction in separation factors when moving from non-chlorinated to chlorinated phases) can be related to different causes (variation in different interaction terms and/or steric constraints). The principal features of retention and separation are summarized in Table 3.

4. Conclusion

In this paper we have shown that the introduction of chlorine atoms on the polysaccharide stationary phases has consistent effects on retention properties (essentially changes in hydrogen bonding capabilities) but varied effects on enantioseparation properties. Chemometric strategies were applied to characterize the columns in terms of their retention characteristics assessed by the solvation parameter model and separation capabilities assessed by discriminant analysis. The unique design of the discriminant analysis (two by two) allowed us to unravel the structural features that are more or less favourable on the different stationary phases. It is not our purpose to discuss every single change between the different columns and obviously, some cases are much more difficult to explain than the examples selected here. On the contrary, our study demonstrates that successful enantioseparation on polysaccharide CSP is not the result of a simple interaction model (like the famous Dalglish model of three-point interaction [33]) but a conjunction of favourable features that vary depending on the column and the compound. Our result and discussion provide some insights on the molecular features or interaction that contribute to the enantioseparation on the chlorinated and non-chlorinated polysaccharide CSP studied here.

Acknowledgements

Waters is greatly acknowledged for the UPC² system let at our disposal. We are very grateful to the manufacturers who kindly provided the stationary phases for this study: Pilar Franco (Chiral Technologies), Magali Dupin, Tivadar Farkas and Marc Jacob (Phenomenex), Bezhan Chankvetadze (Tbilisi State University) and Jelena Kocergin (Regis Technologies).

References

- [1] K.W. Phinney, *Anal. Chem.* 72 (2000) 204A.
- [2] T. Ikai, Y. Okamoto, *Chem. Rev.* 109 (2009) 6077.
- [3] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 26.
- [4] Y. Zhang, W. Watts, L. Nogle, O. McConnell, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 75.
- [5] C.K. Van Pelt, T.N. Corso, G.A. Schultz, S. Lowes, J. Henion, *Anal. Chem.* 73 (2001) 582.
- [6] Y. Zhang, J. Dai, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, *Chirality* 19 (2007) 683.
- [7] K. De Klerck, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 110.
- [8] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 336.
- [9] E.R. Francotte, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 379.
- [10] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chem. Lett.* 22 (1993) 617.
- [11] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 39.
- [12] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 101.
- [13] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1295.
- [14] Chris Hamman, M. Wong, Marc Jacob, Zachary S. Breitbach, *LCGC Asia Pacific eNews* June (2012).
- [15] K.S.S. Dossou, E. Farcas, A.C. Servais, P. Chiap, B. Chankvetadze, J. Crommen, M. Fillet, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 56.
- [16] L. Peng, S. Jayapalan, B. Chankvetadze, T. Farkas, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6942.
- [17] C. West, A. Bouet, S. Routier, E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 325.
- [18] C. West, A. Bouet, I. Gillaizeau, G. Coudert, M. Lafosse, E. Lesellier, *Chirality* 22 (2010) 242.
- [19] A. Tarafder, K. Kaczmariski, M. Ranger, D.P. Poe, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 132.
- [20] C. Wang, Y. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1281 (2013) 127.
- [21] C. West, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2019.
- [22] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang, L. Morin-Allory, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2033.
- [23] S. Khater, Y. Zhang, C. West, submitted for publication in *J. Chromatogr. A* JCA-14-908.
- [24] K.S.S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A.-C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7450.
- [25] H. Kažoka, O. Koliškina, G. Veinberg, M. Vorona, *J. Chromatogr. A* 1281 (2013) 160.
- [26] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chem. Lett.* 29 (2000) 352.
- [27] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, Y. Isobe, T. Michishita, T. Murakami, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 882.
- [28] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chem. Lett.* 29 (2000) 1176.
- [29] E. Francotte, D. Huynh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 421.
- [30] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguiñón, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 155.
- [31] K. De Klerck, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 85.
- [32] T. Zhang, P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi, T. Murakami, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 178.
- [33] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* (1952) 3940 (Resumed).

III. Application de la stratégie chémoinformatique à la caractérisation d'autres chimies de PSC

Introduction

Dans les années 2000, Roussel *et al.* proposent une classification de PSC qui repose sur deux catégories : les sélecteurs moléculaires caractérisés par des petites molécules bien définies et les sélecteurs polymériques définis par des macromolécules synthétiques ou naturelles [22]. Les interactions du complexe bimoléculaire soluté-sélecteur sont aisément reconnues à l'aide d'outils de modélisation moléculaire, qui identifient les conformations les plus stables [23]. Des outils plus aboutis sont nécessaires pour décrire le mécanisme de reconnaissance chirale des sélecteurs polymériques, plus complexe.

La méthodologie développée dans les deux derniers articles a été appliquée afin d'étudier le mécanisme de reconnaissance chirale d'une phase de type Pirkle, Whelk-O1 en chromatographie en phase supercritique. La structure de sélecteur chirale est présentée Figure 2.8. Elle consiste en la fixation d'une petite entité optiquement active sur un gel de silice. Cette PSC permet de couvrir un large spectre d'applications associé à des bonnes performances chromatographiques, comparable à celles des PSC de type polysaccharide [24].

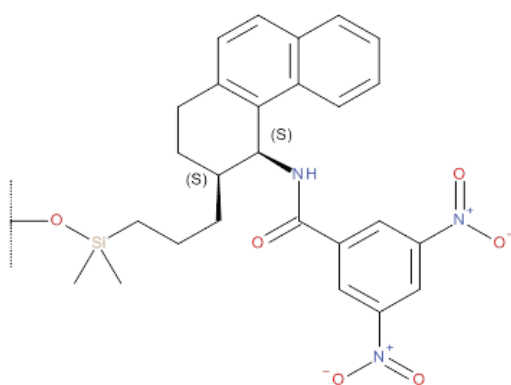


Figure 2.8 : Structure de la PSC (S,S)-Whelk-O1

Dans cette étude, les propriétés de rétention sont mises en relief à travers l'utilisation du modèle modifié des paramètres de solvation (Eq. 2.3) alors que les capacités énantiosélectives sont identifiées par l'emploi de l'analyse factorielle discriminante.

Vue d'ensemble – Classification

Sans a priori sur les propriétés de la phase étudiée, des classifications ascendantes hiérarchiques (CAH) ont été réalisées afin d'identifier les similarités/dissimilarités de WhelkO-1 avec les PSC caractérisées dans la partie II de ce chapitre.

La CAH, figure 2.9a, repose sur les logarithmes normalisés des facteurs de rétention ($\log k$) de 161 espèces non chirales. Elle met en avant les capacités des PSC à interagir via des interactions non-spécifiques. En termes de rétention, elle n'est pas aussi singulière que ce que l'on pouvait attendre et son comportement est proche de ceux de Lux Cellulose-2, Chiralpak AD et Chiralcel OD. Les similarités de rétention avec des dérivés phenylcarbammates peut s'expliquer à travers le caractère aromatique de la phase Pirkle et la présence d'un groupement amide.

La CAH, figure 2.9b, a été réalisée sur les logarithmes normalisés des facteurs de séparation ($\log \alpha$) de 93 racémiques. Les capacités énantiosélectives de WhelkO-1 s'apparentent à celle de Chiralpak AS, et se singularisent du reste des PSC.

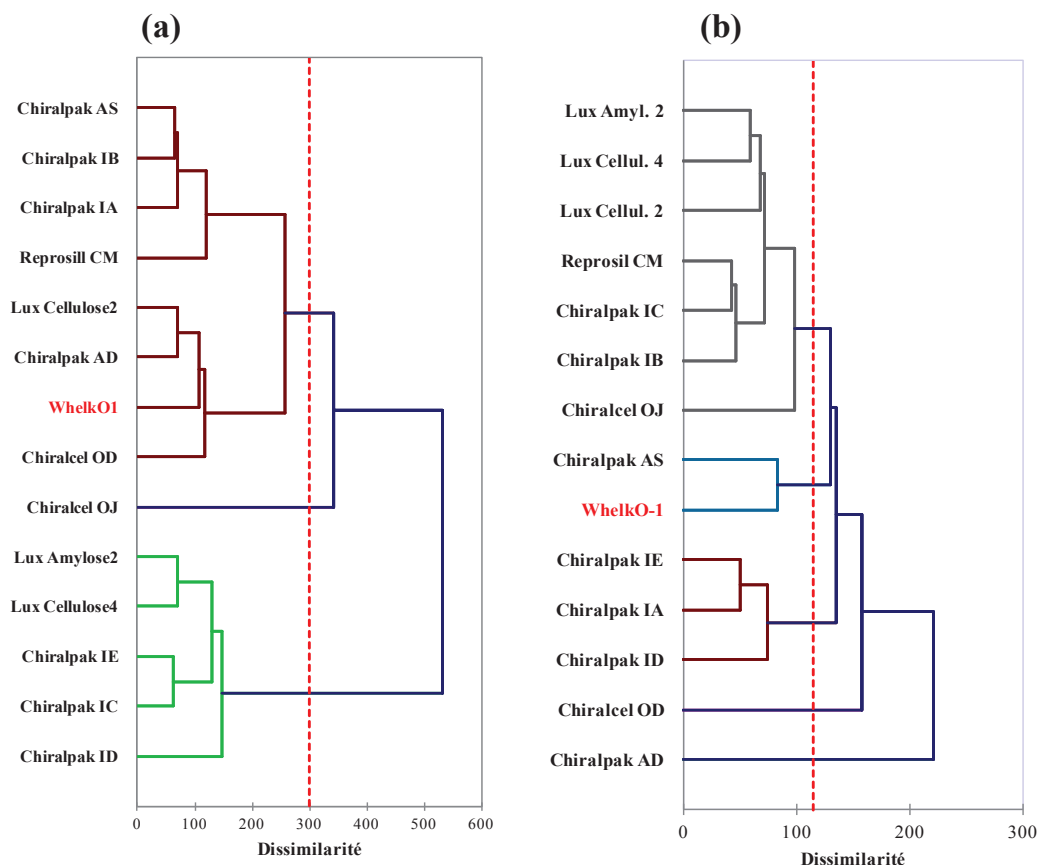


Figure 2.9 : Agglomération des PSC selon (a) leur rétention et (b) leurs capacités énantiosélectives

Description du comportement rétentif – modèle LSER

Le modèle de rétention de la phase WhelkO-1 est présenté Figure 2.10. La rétention est gouvernée par la contribution majoritaire des interactions π - π (coefficient e). En effet, c'est une phase hybride qui contient un noyau accepteur et donneur d'électrons π via les groupements dinitrophenyle et naphthyle. La rétention repose aussi sur la contribution des liaisons hydrogènes (coefficients a et b), notamment entre l'amide du sélecteur chiral et les composés acides ou basiques. Le coefficient v positif indique des interactions dispersives avec les groupements aromatiques, surtout le groupement tétrahydrophénanthrène. Le coefficient g négatif suggère une résistance stérique à l'insertion des molécules sphériques, ce qui suggère que la forme de la molécule doit être parfaitement adaptée au sélecteur.

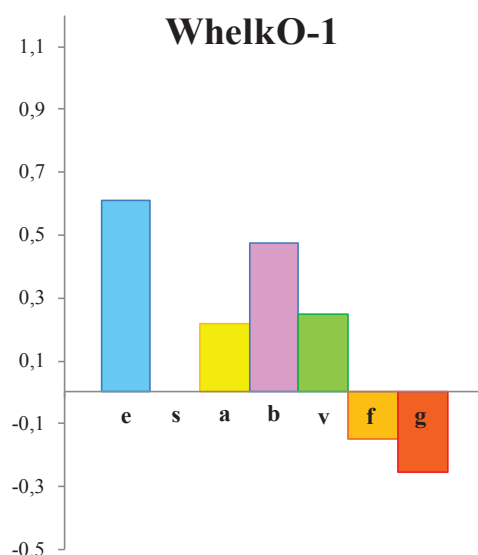


Figure 2.10 : Constantes Béta du modèle de Whelk-O1

En effet, Kosho *et al.* [25] ont montré l'importance de la conformation du sélecteur dans le contrôle de la rétention. Un sillon est formé entre les groupements naphthyle et dinitrophenyle. Ils proposent un mécanisme basé sur la règle des trois points de Dalglish. L'énantiomère le plus retenu est présent dans le sillon et peut former les trois types d'interactions : π - π face-to-face, π - π edge-to-face et des liaisons hydrogène. L'énantiomère le moins retenu est situé en dehors du sillon et ne peut pas former la troisième interaction π - π edge-to-face avec le groupement naphthyle [26,27].

A partir des valeurs des constantes du système (Table 2.1) et des modèles de rétention (Figure 2.10 et 2.11), il est difficile d'expliquer les similarités observées entre la phase WhelkO-1 et les dérivés polymériques.

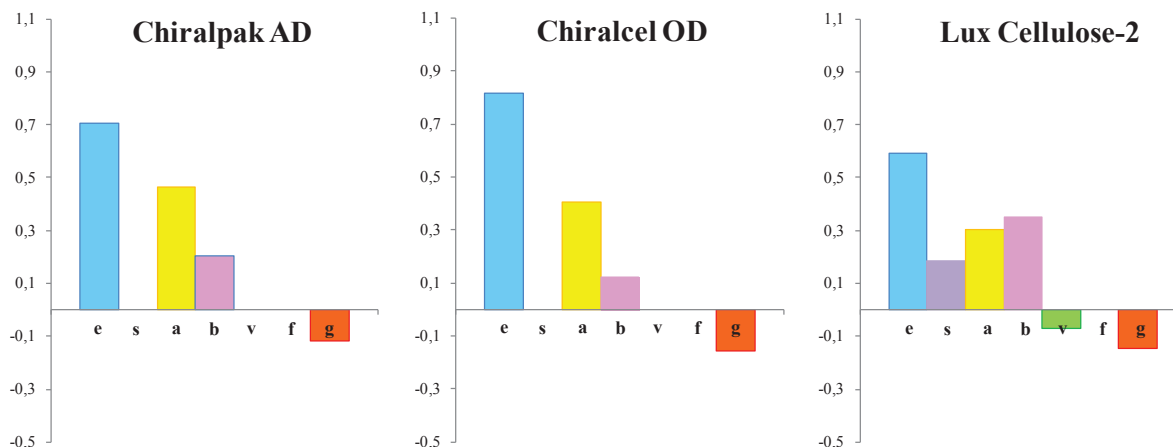


Figure 2.11 : Caractérisation rétentive des PSC Chiralpak AD, Chiralcel OD et Lux Cellulose-2 à l'aide du modèle modifié des paramètres de solvation (Eq. 3)

Les caractères aromatique et basique sont moins marqués que sur les PSC polysaccharides au contraire du caractère acide de WhelkO-1 qui est clairement plus important. La comparaison de la rétention des composés achiraux sur WhelkO-1 et les trois autres phases indique des corrélations relativement faibles avec des valeurs de R^2 comprises entre 0,73 et 0,77. La similarité entre ces supports pourrait être liée à l'existence du sillon sur WhelkO-1, qui n'est pas sans rappeler le concept d'inclusion, associé à des interactions attractives, des phases polysaccharides [28].

Colonnes	Constantes du systèmes							Statistiques			
	e	s	a	b	v	f	g	n	R ² _{adj}	SE	F
WhelkO-1	0,508		0,311	0,749	0,263	-0,048	-0,176	192	0,922	0,128	376
	0,025		0,031	0,037	0,039	0,012	0,016				
Chiralpak AD	0,731		0,718	0,338			-0,164	208	0,843	0,198	278
	0,029		0,045	0,048			0,039				
Lux Cellulose-2	0,523	0,224	0,473	0,589	-0,071		-0,201	190	0,908	0,147	373
	0,030	0,046	0,038	0,051	0,042		0,053				
Chiralcel OD	0,694		0,535	0,175			-0,181	200	0,882	0,141	372
	0,021		0,033	0,037			0,028				

Tableau 2.1 : Constantes du système obtenues par analyse LSER

Description du comportement énantiosélectif – AFD

A partir de la prédiction de la rétention, l'analyse factorielle discriminante partage le jeu de composé en quatre classes :

- Classe 1 comprend les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élués avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (3)
- Class 2 comprend les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élués après la prédiction de rétention basée sur Eq. (3)
- Class 3 comprend les racémiques séparés ($\alpha = 1$) et élués avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (3)
- Class 4 comprend les racémiques séparés ($\alpha = 1$) et élués après la prédiction de rétention basée sur Eq. (3)

La figure 2.12 identifie les caractéristiques structurales communes aux racémiques élués « avant » ou « après » la prédiction de rétention (classe 1/2 et 3/4). En effet, les descripteurs pointant vers la gauche sont des propriétés communes aux racémiques les moins retenus alors que ceux pointant vers la droite concernent les racémiques les plus retenus. Les racémiques les plus retenus, séparés ou non, semblent être des molécules volumineuses (descripteur V pointant vers la droite) alors que les racémiques les moins retenus sont de petites molécules sphériques (descripteur G pointant vers la gauche). Les molécules les plus retenues forment des complexes plus stables via la contribution des autres caractéristiques structurales (descripteurs E, S, A et B pointant vers la droite).

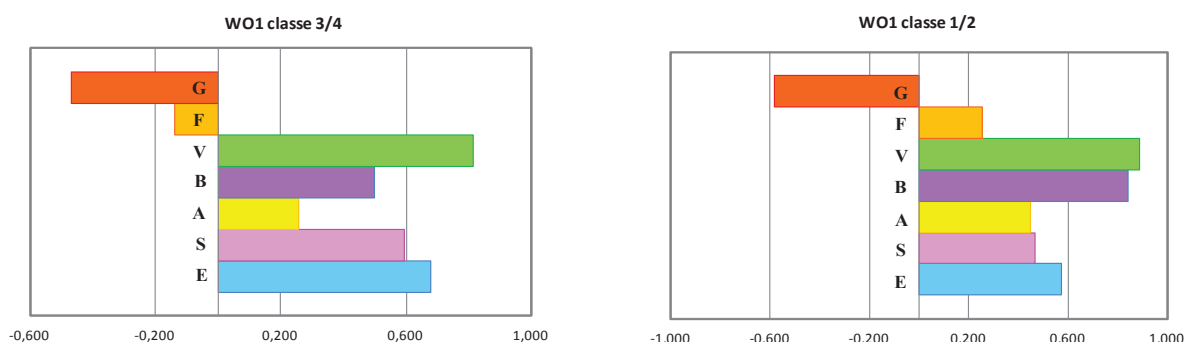


Figure 2.12 : Modèles discriminant les racémiques « élus avant » et « après » la prédiction de rétention sur WhelkO-1. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques élués avant la prédiction de rétention (classe 1 et classe 3). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques élués après la prédiction de rétention (classe 2 et classe 4).

Cette description est en contradiction avec les résultats obtenus lors de la caractérisation des phases polysaccharides non halogénés. En effet, les racémiques les plus retenus sont généralement de petites molécules sphériques qui minimisent la résistance stérique et favorisent leur insertion dans les cavités chirales des polymères dérivés.

La figure 2.13 identifie les caractéristiques structurales communes aux racémiques « séparés » ou « co-élus » (classe 1/3 et 2/4). En effet, les descripteurs pointant vers la gauche sont des propriétés communes aux racémiques co-élus alors que ceux pointant vers la droite concernent les racémiques séparés. Pour les racémiques les moins retenus, la flexibilité est une propriété significativement préjudiciable à la séparation. L'orientation du naphthyle induit d'ailleurs une conformation du sélecteur chiral rigide.

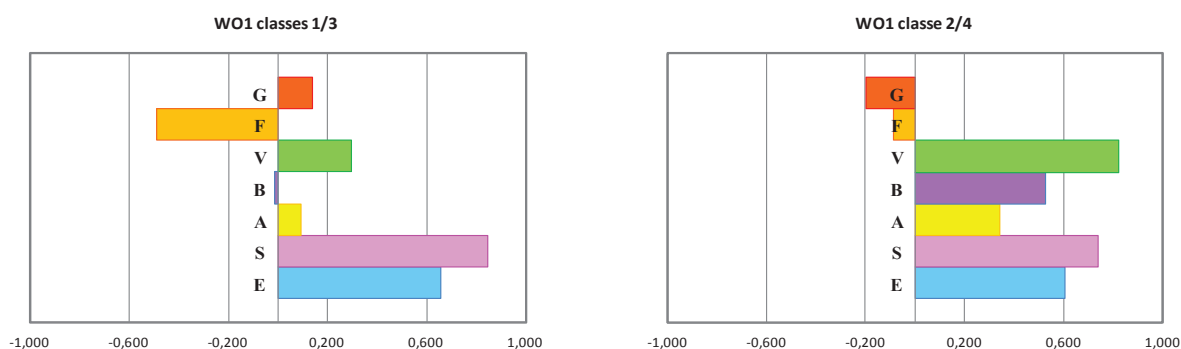


Figure 2.13 : Modèles discriminant les racémiques séparés et co-élus sur WhelkO-1. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques co-élus (classe 3 et classe 4). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques séparés (classe 1 et classe 2).

Dans la classe 1/3 (racémiques élués avant la prédiction), la séparation est favorisée par la contribution de E (aromaticité et polarisabilité), S (caractère dipolaire et polarisable), et dans une moindre mesure V (volume moléculaire). La contribution des liaisons hydrogène est ici négligeable. Par exemple, les racémiques 1-phenyl-1-propanol, phenylvinylcarbinol et 1-phenyl-2-propyn-1-ol appartiennent à la classe 1/3 (Figure 2.14). Ils se distinguent par l'intensité du caractère polarisable (E et S). La molécule 1-phenyl-2-propyn-1-ol présente de fortes capacités d'interactions de type *e* et *s*, à travers la triple liaison et appartient à la classe 1 ($\alpha = 1,10$). Une diminution du caractère polarisable entraîne une diminution de la probabilité de séparation : 1-phenyl-2-propanol et 1-phenyl-2-propanol appartiennent à la classe 3.

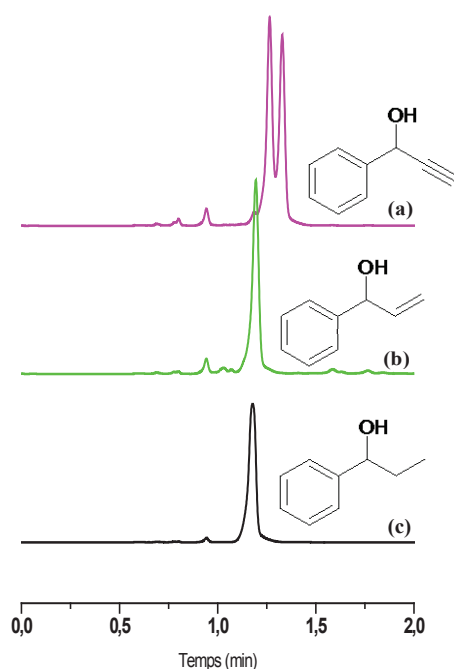


Figure 2.14 : Analyse du (a) 1-phenyl-2-propyn-1-ol, (b) phenylvinylcarbinol et (c) 1-phenyl-1-propanol sur WhelkO-1

Dans la classe 2/4, la séparation repose sur l'existence simultanée de nombreuses interactions : liaisons hydrogène (A et B), π - π et dipôle-dipôle (E et S). Les racémiques 4,5,7-trihydroxyflavanone et 6-méthoxyflavanone appartiennent à la classe 2/4 et diffèrent par leur capacité à former des liaisons hydrogène, alors que leurs structures sont par ailleurs très similaires. L'absence d'hydroxyles sur la structure du 6-méthoxyflavanone empêche la création de liaisons hydrogènes et une co-élution est alors observée (Figure 2.15).

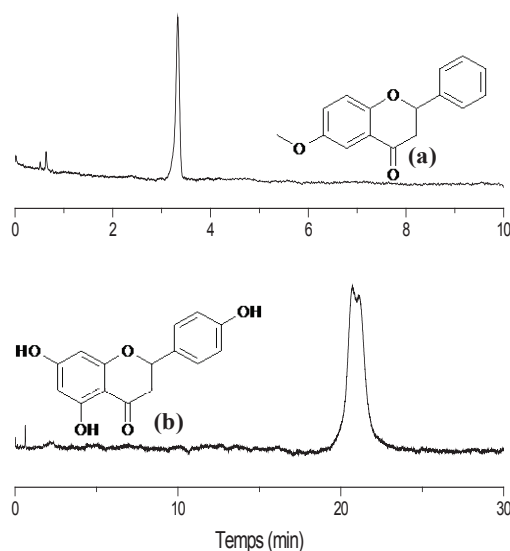


Figure 2.15 : Analyse du (a) 6-méthoxyflavanone et (b) 4,5,7-trihydroxyflavanone sur WhelkO-1

Conclusion

Cette étude présente l'utilisation du modèle modifié des paramètres de solvation pour caractériser la rétention et les capacités énantiosélectives d'une phase de type Pirkle, WhelkO-1. Ce travail préliminaire nous permettra par la suite d'interpréter la position de cette phase dans une classification générale.

Références du chapitre II

- [1] A. Del Rio, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1566.
- [2] R. Kaliszan, Anal. Chem. 64 (1992) 619A.
- [3] R. Kaliszan, Chem. Rev. 107 (2007) 3212.
- [4] C. West, E. Lesellier, J. Chromatogr. A 1110 (2006) 181.
- [5] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, A. Berthod, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 70.
- [6] A. Wang, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 965 (2002) 3.
- [7] L. Szepeszy, J. Sep. Sci. 26 (2003) 201.
- [8] J.S. Jover, R.n. Bosque, J. Sales, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44 (2004) 1098.
- [9] M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 29.
- [10] M. Vitha, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 143.
- [11] C. West, E. Lesellier, J. Chemom. 26 (2012) 52.
- [12] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.-L. Finaru, C. Elfakir, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5939.
- [13] C.R. Mitchell, N.J. Benz, S. Zhang, J. Chromatogr. B 875 (2008) 65.
- [14] A. Berthod, C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 61.
- [15] K. Héberger, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 273.
- [16] S. Caetano, J. Aires-de-Sousa, M. Daszykowski, Y.V. Heyden, Anal. Chim. Acta 544 (2005) 315.
- [17] C. West, Y. Zhang, L. Morin-Allory, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2019.
- [18] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang, L. Morin-Allory, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2033.
- [19] Y. Zhang, W. Watts, L. Nogle, O. McConnell, J. Chromatogr. A 1049 (2004) 75.
- [20] A. Del Rio, J. Gasteiger, J. Chromatogr. A 1185 (2008) 49.
- [21] B. Natalini, R. Sardella, A. Macchiarulo, R. Pellicciari, J. Chromatogr. B 875 (2008) 108.
- [22] C. Roussel, A.D. Rio, J. Pierrot-Sanders, P. Piras, N. Vanthuyne, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 311.
- [23] K.B. Lipkowitz, D.J. Malik, T. Darden, Tetrahedron Lett. 27 (1986) 1759.
- [24] B.P. Nagori, M.S. Deora, P. Saraswat, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res 6 (2011) 106.
- [25] M.E. Koscho, P.L. Spence, W.H. Pirkle, Tetrahedron: Asymm. 16 (2005) 3147.
- [26] W.H. Pirkle, C.J. Welch, B. Lamm, The J. Organic Chem. 57 (1992) 3854.

- [27] W.H. Pirkle, C.J. Welch, S.R. Wilson, *Chirality* 6 (1994) 615.
- [28] I.W. Wainer, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 6 (1987) 125.

Chapitre III

Impact de la nature de la phase mobile sur les séparations chirales

I. Préambule

Le mode chromatographique, le pourcentage et la nature des modificateurs et les paramètres thermodynamiques vont étroitement affecter le mécanisme de reconnaissance chirale. Ces paramètres peuvent, par exemple, induire un phénomène encore mal compris, l'inversion d'ordre d'élution énantiomérique.

Dans ce chapitre, nous discuterons d'abord de l'influence de la composition de la phase mobile en SFC. En raison de son caractère « apolaire », la force éluante du CO₂ est modulée par l'emploi de solvants organiques polaires dits « traditionnels ». L'utilisation du méthanol, de l'éthanol et de l'isopropanol comme modificateur dans la phase mobile est très souvent rencontrée lors de screening chiraux. Nous chercherons à savoir de quelle manière le modificateur affecte l'environnement des cavités chirales, ainsi que leur accessibilité.

Puis, nous nous intéresserons au transfert HPLC-SFC en étudiant le comportement rétentif et séparatif de composés achiraux et chiraux dans l'éluant liquide et dans une phase mobile composée majoritairement de CO₂. Comprendre les différences majeures entre ces deux modes chromatographiques permettra d'envisager le transfert de méthode chirale de manière plus rigoureuse.

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous nous attarderons sur l'influence des additifs sur la séparation chirale en SFC. Le caractère « acide » du dioxyde de carbone [1] offre la possibilité de se substituer à l'ajout d'un additif acide pour l'analyse de composés acides. L'ajout d'un additif basique permet de minimiser les interactions ioniques entre l'entité cationique et les sites actifs de la phase stationnaire. Il peut également contrôler l'état d'ionisation d'un acide par la formation d'une paire d'ion [1]. Au-delà de l'effet sur la forme des pics, nous étudierons l'impact sur la rétention et la sélectivité énantiomérique.

II. Influence du modificateur en SFC chirale

Ce travail rapporte l'emploi de modificateurs alcooliques et leur impact sur la rétention et la sélectivité chirale en chromatographie en phase supercritique sur des PSC polysaccharides.

Syame Khater, Caroline West

Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography V.
Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with polysaccharide
stationary phases

Journal of Chromatography A, 1373 (2014) 197-210



Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography V. Effect of the nature and proportion of alcohol mobile phase modifier with amylose and cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phases

Syame Khater, Caroline West*

Université d'Orléans, Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS UMR 7311, B.P. 6759, rue de Chartres, 45067 Orléans Cedex 2, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2014

Received in revised form

11 November 2014

Accepted 12 November 2014

Available online 18 November 2014

Keywords:

Alcoholic modifier

Chemometrics

Enantiomer separation

Polysaccharide chiral stationary phase

Solvation parameter model

ABSTRACT

In enantioselective supercritical fluid chromatography (SFC) with chiral stationary phases (CSP), the elution strength of carbon dioxide is usually modulated by the use of polar organic solvents, also called modifiers. Alcohols like methanol, ethanol and isopropanol are the most commonly used co-solvents. While most applications of chiral SFC are optimized through a process of varying the co-solvent nature and proportion, only a limited number of thorough investigations have been carried out to unravel the effects of the co-solvent on the enantioseparation process.

In an attempt to clarify the effect of the mobile phase co-solvent on enantioselective SFC separations, a wide range of compounds (achiral and chiral) were analyzed on an amylosic (Chiralpak AD-H) and a cellulosic (Lux cellulose-1) CSP. The influence of the modifier polarity and steric hindrance must be considered thus several different alcoholic solvents were evaluated: methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol and 1-butanol, with a proportion of 10% in carbon dioxide. A selected group of racemates was further analyzed with varying proportions of each alcohol ranging from 5 to 25%. Besides, because mixtures of solvents were sometimes reported to produce unexpected results, a 50:50 mixture of methanol and ethanol was also evaluated. Chemometric methods provide some insight into the enantio-separation process and help identifying the differences between the mobile phase conditions.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past twenty years, chiral chromatography has been deeply developed, most particularly with chiral stationary phases (CSP). The mechanisms contributing to successful chiral discrimination are still not fully understood, although several groups have attempted at improving this point [1–3]. In our laboratory, we try to rationalize chiral separation processes in packed column sub- and supercritical fluid chromatography (SFC) in order to identify the appropriate parameters to meet specific chiral separation demands. Firstly, the most important parameter to optimize is the nature of the chiral selector. Our previous studies reported the major interactions involved in the chiral recognition mechanism of polysaccharide-based CSP using a modified version of linear solvation energy relationship (LSER) and discriminant analysis [4–8]. Polysaccharide-based CSP have a heterogeneous surface and thus

different types of binding sites. The mechanism results from both non-specific interactions that determine the retention of the enantiomer on a CSP (from the supporting matrix, the polysaccharide backbone, residual hydroxyl groups on the polymer and bonded ligands) and enantioselective interactions that determine the separation [9].

Secondly, the composition of the mobile phase (MP) must be also considered as a critical parameter, as it is also a significant actor in the enantioseparation process. The major MP component (CO₂), modifiers or additives could all affect the chiral recognition mechanism in several ways. Carbon dioxide has an acidic nature [10]. Indeed, the carbon atom is a Lewis acid, and carbon dioxide is known to react with alcohol molecules to form alkylcarbonic acid [11,12]. As a result, acidic additives are not always necessary for the analysis of acidic racemates in SFC.

In addition, pressurized carbon dioxide has an elution strength close to that of hexane, which is not sufficient for most polar compounds. The elution strength of carbon dioxide is then often modulated by the use of traditional SFC modifiers as methanol (MeOH), 2-propanol (2PrOH), ethanol (EtOH), and sometimes

* Corresponding author. Tel.: +33 238494778; fax: +33 238417281.
E-mail address: caroline.west@univ-orleans.fr (C. West).

acetonitrile [13]. Methanol is the most commonly used to achieve efficient separation [14]. Its low boiling point is particularly favourable to scale-up for the purification of large quantities of isolated enantiomers with preparative SFC, as it is easily evaporated from the purified fractions thus avoids residual solvent and minimized energy costs related to evaporation [15,16]. It also provides efficient and sensitive MS ionization through its low surface tension. Organic modifiers usually enhance the solubility of polar solutes (as most pharmaceuticals [17,18]), improve the chromatographic performance (peak shape) and modulate the selectivity. When traditional modifiers are not sufficient, non-traditional solvents (as dichloromethane, tetrahydrofuran, ethyl acetate, etc.) can be envisaged [19,20]. They are compatible with immobilized and bonded CSP, as a second approach to improve solubility and obtain adequate selectivity.

Many papers have been published on the SFC separation of enantiomers using CO₂ mixed with alcohol solvents [12,19,21]. Alcohol modifiers affect the quality of the enantioseparation in numerous ways and the changes are difficult to predict. Both the solute-mobile phase and stationary phase-mobile phase interactions are expected to be different when changing the nature of the alcohol modifier.

- (i) The modifier can alter the polarity of the mobile phase and its viscosity, thereby affecting its density. The former issues from different possibilities of interaction between the analytes and mobile phase components, but also from the above-mentioned reactions between carbon dioxide and alcohols causing the formation of alkylcarbonic acids. Density variations are rather minor under the operating conditions used in this study (high pressure and low temperature) where compressibility of the fluid is limited. Recently, Tarafder et al. discussed the effect of pressure and density in the sub- and super-critical area. It was recommended to operate under conditions of low compressibility of CO₂ to avoid mobile phase variation along the column and poor column efficiency [22]. However, it is possible that solvents with different viscosities will result in different peak efficiencies.
- (ii) Adsorbed mobile phase components [23] also change the stationary phase character (*i.e.* alter the properties of interaction environment), alter the phase ratio (*i.e.* solvation of the polymer chain) and modify the three-dimensional structure [24] (*i.e.* accessibility, size of chiral cavities).

Both non-specific interactions and steric constraints are important considerations to take into account when studying chiral discrimination. One way of assessing the interactions contributing to retention is to use quantitative structure–retention relationships (QSRR). Among the considerable number of possible QSRR, the most popular linear solvation energy relationships (LSER) have been applied to probe the changes in MP composition in achiral SFC [25–28]. In the present paper, LSER strategy was applied to get an insight in the chiral recognition mechanism and we report on:

- (i) the influence of the trio of most commonly used alcohol modifiers MeOH, EtOH and 2PrOH on the retention and separation ability of *tris*-(3,5-dimethylphenyl)carbamate of amylose (Chiralpak AD-H) and cellulose (Lux Cellulose-1);
- (ii) the influence of the alcoholic carbon chain (2PrOH versus 1-propanol and 1-butanol) on the steric constraint;
- (iii) the influence of increasing concentrations of co-solvent on enantioseparations;
- (iv) the comparison between a dual (MeOH–EtOH designated by MeEt) and single (MeOH or EtOH) co-solvent system on the chiral environment.

2. Materials and methods

2.1. Stationary phases

The columns selected for this study were Chiralpak AD-H (Daicel, Tokyo, Japan) and Lux Cellulose-1 (Phenomenex, Le Pecq, France). The dimensions of the columns were 150 mm × 4.6 mm, 5 μm and 250 mm × 4.6 mm, 5 μm respectively. In the tables and figures, the two columns will be identified as AD and LC1 respectively.

2.2. Chemicals

The solvents used were HPLC-grade methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 1-propanol (1PrOH), 2-propanol (2PrOH) and 1-butanol (BuOH) provided by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Carbon dioxide was provided by Messer (Puteaux, France). Solutions of all test compounds were prepared in MeOH. 171 achiral compounds were obtained from a range of suppliers. The majority of the 97 racemates were from commercial sources while a small proportion of them were in-house synthesized products whose formulas are confidential.

Each solute descriptors used for QSRR were extracted from an in-house database established from all available literature on the solvation parameter model. The complete lists of compounds and descriptors can be found in Supplementary Information, Table S1 (achiral) and Table S2 (chiral).

Supplementary Tables S1 and S2 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.033>.

2.3. Apparatus and conditions

The Waters Acquity UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²) was equipped with a binary solvent delivery pump compatible with mobile phase flow rates up to 4 mL min^{−1} and pressures up to 414 bar, an auto-sampler that included partial loop volume injection system, a backpressure regulator, two column ovens (one compatible with 150 mm length columns and the other one compatible with 250 mm length columns) and a PDA detector. The Empower software was used for system control and data acquisition.

The mobile phase used in this study is CO₂-co-solvent 90:10 (v/v), unless otherwise specified. Flow rate was 3 mL min^{−1}. The temperature was set at 25 °C and the outlet pressure was maintained at 150 bar for both columns and all mobile phase compositions. While additives are commonly used to enhance peak shape (*i.e.* peak tailing and broadening) of ionizable compounds, we decided not to use any of them in the mobile phase for this particular study. Additives may adsorb onto the CSP and complicate the understanding of chiral mechanism. Our present goal is to improve understanding of chiral separations, not to optimize them, so additives effect shall be the topic of further studies.

Injection volume was 1 μL for all compounds. Retention factors (*k*) were calculated based on the retention time *t_R*, determined using the peak maximum (even when tailing did occur, for some of the most basic compounds) and on the hold-up time *t₀* measured on the first negative peak due to the unretained sample solvent.

2.4. Data analysis

All multivariate data analyses were performed using XLStat 2014.3.02 software (Addinsoft, New York, NY).

QSRR models were obtained with partial least square regression (PLS). The use of PLS regression is advised when there are more variables than observations, which is not the case here, but

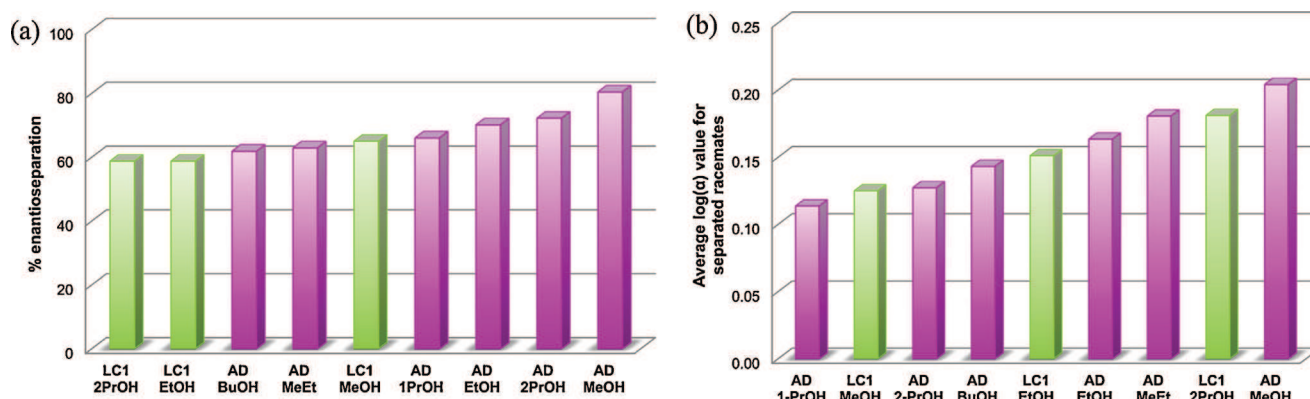


Fig. 1. Overall performance observed on two polysaccharide-based chiral stationary phases, Chiralpak AD-H (AD) and Lux Cellulose-1 (LC1), using different alcoholic modifiers (methanol MeOH, ethanol EtOH and 2-propanol 2PrOH on both columns; 1-propanol 1PrOH, 1-butanol BuOH and methanol–ethanol 50:50 MeEt on Chiralpak AD-H). (a) Success rate measured on each chromatographic system and (b) average of separation factors for separated racemates.

also when there is multi-collinearity between the variables. However, it is well known that the Abraham descriptors are somewhat correlated (for instance, E and S, S and B, E and V) thus standard regression sometimes fail to correctly assess the effects of different variables. For instance, we have often observed that the vV term was found of no significance, while the chromatograms indicate that increasing molecular volume caused increased or decreased retention thus the models obtained were not always in accordance with our experiments. In the present case, we have observed that PLS regression was much more successful in producing a retention model that was in accordance with chromatographic experiments and chemical sense. PLS regression was thus conducted on a complete table of retention data for Chiralpak AD-H on the one hand, Lux Cellulose-1 on the other hand. The Y matrix thus contained the retention data measured for achiral compounds on one single column with all mobile phase composition, while the X matrix contained the seven molecular descriptors. As a result, the regression models obtained for each co-solvent are easily compared because they were obtained with the same calculation, based on the same data table and the variations observed cannot be due to different compounds included in the regression that may act as lever points.

The quality of the QSRR fits was estimated using the overall determination coefficient (R^2) and standard error in the estimate (SE). The statistical significance of individual coefficients was evaluated using the standard error.

For agglomerative hierarchical clustering (AHC), Ward's method was used to cluster the normalized data, and the Euclidean distance defined the distance between two clusters.

Discriminant analysis (DA) were conducted on the same data table as the AHC, thus the same compounds are included in the data analysis and no particular compound can be suspected to cause significantly different conclusions from one solvent to another. The quality of discriminant analyses was estimated based on ROC (receiver operating characteristics) curves and confusion matrices.

Abraham solute descriptors (E, S, A, B and V) were extracted from an in-house database established from all available literature on the solvation parameter model, or, for those compounds that cannot be found in the literature, calculated with the Absolv Webboxes program, based on ADME Boxes version 3.5 (Pharma Algorithms, ACD Labs, Toronto, Canada). Additional descriptors (F and G) were computed in-house with MOE 2009.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Canada), and QikProp 2009/08/20 (Schrödinger) [5]. A stochastic conformational analysis was performed with MOE 2009.10 with the following parameters: maximum number of iterations 10,000; RMS gradient 0.005; maximum number of rejected structures 50; MM iteration limit 500; RMSD limit 0.25; strain cut

off 1; conformation limit 1 (so as to retrieve only the conformation with the minimum energy).

The complete table of descriptors for achiral and chiral compounds can be found in supplementary information.

3. Results and discussion

3.1. General overview

3.1.1. Based on success rates

As it was specified before, methanol, isopropanol and ethanol are the most widely used co-solvents in a primary chiral screening [29]. But are they all useful to achieve good complementarities? And what about others alcohols?

First of all, these three alcohol modifiers were evaluated on Chiralpak AD-H and Lux Cellulose-1. Additionally, on Chiralpak AD-H, which is often reported to be the most successful CSP, we wished to evaluate other co-solvents: 1-propanol (1PrOH), 1-butanol (BuOH) and a 50:50 mixture of methanol and ethanol (MeEt). First of all, the nine chromatographic systems resulting from these combinations were classified in order to evaluate their relative performance towards a wide range of compounds. The bar charts in Fig. 1 represent two different rankings:

- Fig. 1a compares success rates based on the ratio of observed enantioseparations to number of racemates successfully eluted in the present conditions (see above experimental conditions). Any separation factor strictly superior to 1 was considered a “success” regardless the resolution, because we wanted to compare enantioselective capabilities, understanding that a limited resolution could be further optimized by changing the operating conditions (like proportion of modifier and temperature). At first sight, the amylose-type phase using different modifiers mostly occupies the top of the chart. Besides, on each CSP, methanol provides the highest success rate (around 80% for Chiralpak AD-H and 65% for Lux Cellulose-1). The difference between ethanol and 2-propanol is rather small and their potential should be revealed by their specificity (Fig. 2), that is to say the proportion of racemates that were resolved only in the selected conditions and not in the one compared. While there is no clear difference of specificity between the two modifiers on Lux Cellulose-1, more racemates are specifically resolved on Chiralpak AD-H using 2-propanol (7%) when methanol failed.
- Fig. 1b presents a different ranking based on the average separation factors observed for the “successful” cases defined above. Thus the classification is rather based on strong

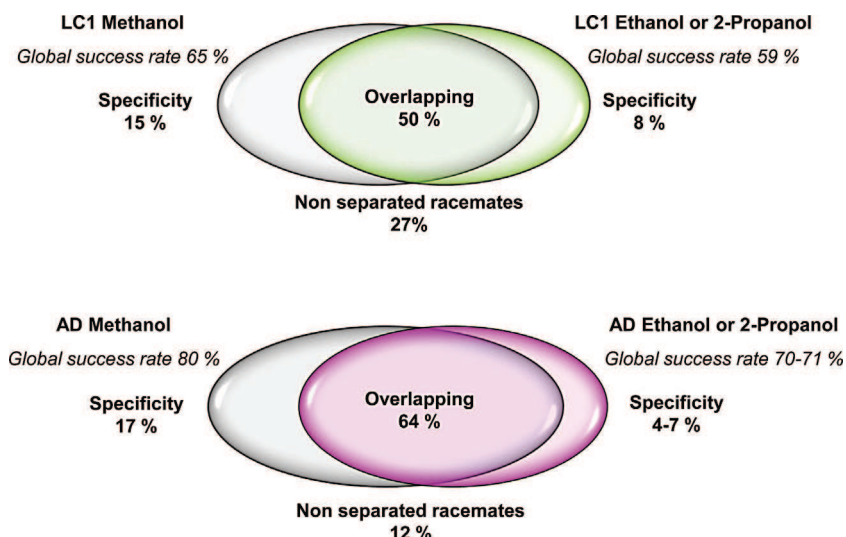


Fig. 2. Venn diagrams representing the global performances using Lux Cellulose-1 (LC1) and Chiralpak AD-H (AD) with different co-solvents.

enantioseparation capabilities, even if they apply to a small proportion of the set of test compounds.

Contrary to the previous figure, the amylose and cellulose phases are heterogeneously ranked. In previous works [8], amylose-based phases provided generally larger average separation factors than cellulose-based phases using methanol as modifier. Naturally, based on the same data set, this observation is still valid in Fig. 1b. However, changing the nature of co-solvent has different effects on the two columns as increasing the chain length of alcohol modifier is beneficial to large enantioseparation factors on Lux Cellulose-1 and detrimental on Chiralpak AD-H. As a result, Lux Cellulose-1 with 2-propanol and ethanol induces large separation factors while in Fig. 1a they provided the lowest success rates. Thus it means that, when enantio-recognition did occur, whatever how often, enantioseparation was good in these cases.

3.1.2. Based on clustering

Two classifications based on agglomerative hierarchical clustering (AHC) were achieved to quickly observe the influence of the modifier on the CSP ability to retain or discriminate the enantiomers (Fig. 3). Ward's method was used to cluster the normalized data, and the Euclidean distance defined the distance between two clusters.

The first AHC (Fig. 3a) is based on the logarithms of retention factors of the achiral test compounds. Only those compounds that could be successfully eluted on both columns and in all mobile phase conditions were retained in this calculation, thus 171 compounds (out of the initial 230 that we have used in previous studies) were used. The data were normalized (centred and reduced) prior to calculation. Thus the observed clustering is rather resulting from comparable elution order regardless of the absolute retention in the selected chromatographic systems.

It appears that two principal groups are formed, one with each CSP. Then a further subdivision can be observed. On both columns, the systems with MeOH and EtOH exhibit close retention profiles while the systems with longer-chain alcohols (1PrOH, 2PrOH and BuOH) are somewhat more distant. Naturally, the system comprising a mixture of solvents (MeEt) is close to the solvents used alone (MeOH and EtOH).

The second AHC (Fig. 3b) is based on the logarithms of separation factors ($\log \alpha$) of the chiral test compounds. Again we wished to retain only those compounds that could be successfully eluted in all cases. However, this would reduce the number of data to a

great extent as some compounds were never observed in some conditions, and they are not necessarily the same between different conditions. As a result, we decided to fill in the gaps of the data table by assuming zero values for the unknowns. Finally, 97 compounds (out of the initial 130 used in our previous works) were used for the calculation.

The clustering is again based on the nature of the polysaccharide backbone as all cellulose systems are grouped at the top of the classification, while amylose systems are grouped at the bottom. Again on both columns, there seems to be a cut between short-chain and long-chain alcohol modifiers. A small difference may be observed as, in this case, EtOH is closer to the long-chain alcohols on Chiralpak AD-H, while the MeEt mixture remains close to MeOH. It can also be noticed that the dissimilarity levels are very close when comparing the two columns. We may conclude that the extent to which the CSP is affected by the nature of the mobile phase composition is similar. This is in contrast with the conclusions from De Klerck et al., who observed that changes in MP polarity affected the conformational structure of the amylose backbone in a more pronounced manner than the cellulose polymer [18].

On Chiralpak AD-H, the use of methanol provides a specific separation profile as it is clearly distinguished from longer-chain alcohols. This was also observed in Fig. 2, as the specificity of MeOH, compared to 1PrOH or 2PrOH is very high (17 and 22%). Together with large success rate (Fig. 1a) and large separation factors (Fig. 1b), MeOH is most desirable for use with Chiralpak AD-H.

3.2. Chemometric strategies employed to describe retention and separation mechanisms

3.2.1. Retention properties characterized with quantitative structure-retention relationships

In our previous works, linear solvation energy relationships (LSER) based on a modified version of the solvation parameter model has been used to describe the intermolecular interactions and steric features [4,5] contributing to retention using the following Eq. (1):

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV + fF + gG \quad (1)$$

In this equation, capital letters represent the solute descriptors, related to particular structural features, while lower case letters represent the system constants, related to the complementary effect of the phases on these interactions. c is the model

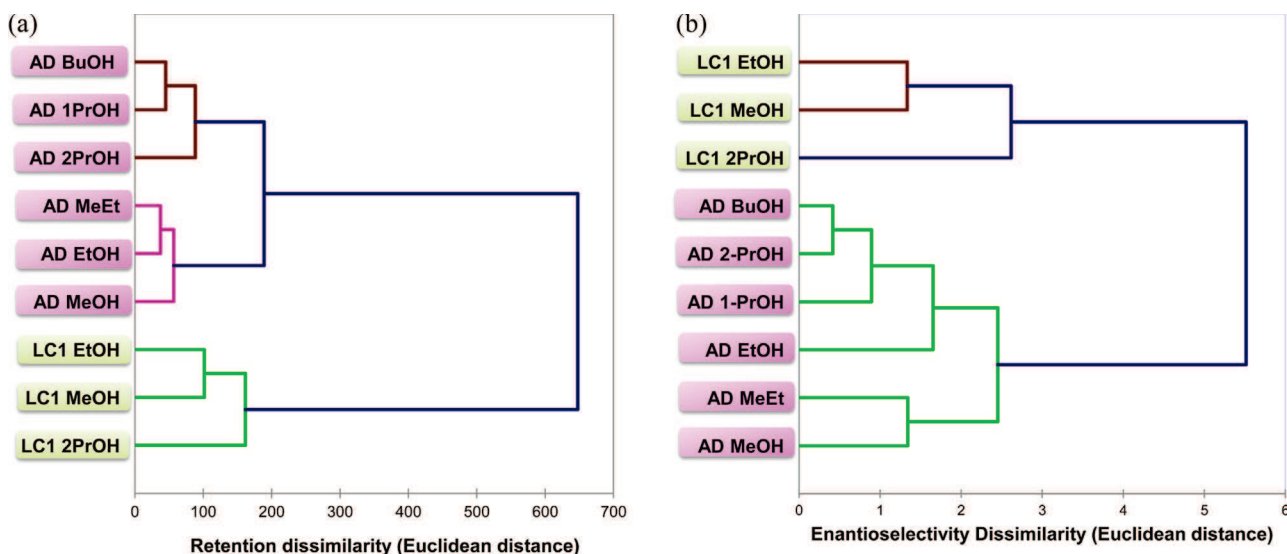


Fig. 3. Agglomerative hierarchical clustering based on (a) the logarithm of normalized retention factors ($\log k$) of 171 achiral compounds and (b) the logarithm of separation factors ($\log \alpha$) of 97 racemates on Chiralpak AD-H (AD) and Lux Cellulose-1 (LC1).

intercept term and is dominated by the phase ratio. E is the excess molar refraction (calculated from the refractive index of the molecule) and models polarizability contributions from n and π electrons; S is the solute dipolarity/polarizability; A and B are the solute overall hydrogen-bond acidity and basicity; V is the McGowan characteristic volume in units of $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}/100$; F is the flexibility of the molecule, calculated as the fraction of rotatable bonds; G is the globularity, qualifying the compactness of the molecule. We previously reported the introduction of the latter two descriptors (F and G) in addition to Abraham descriptors [30,31] (E , S , A , B and V) to identify the spatial constraints that permit the access of the enantiomers towards the active binding sites [4,5]. Flexibility and Globularity were identified among others possible descriptors as two important properties for enantioselective chromatography. Flexibility is important for chiral resolution because flexible molecules have more conformers, thus more ways for intermolecular interactions, which is generally detrimental to enantioresolution. Globularity, or sphericity, can be related to steric impedance to insertion into the stationary phase but also to the possibility for a small molecule to better fit on the walls of a spherical cavity thus establish several interactions at a time. Both flexibility and globularity notions are totally absent from Abraham descriptors.

The system constants (e , s , a , b , v , f , g), obtained through a multi-linear regression of the retention data for a certain number of solutes with known descriptors, reflect the magnitude of difference for that particular property between the mobile and stationary phases. Thus, if a particular coefficient is numerically large, then any solute having the complementary property will interact very strongly with either the mobile phase (if the coefficient is negative) or the stationary phase (if the coefficient is positive).

Thus retention properties were evaluated with Eq. (1) for the nine CSP/MP combinations with PLS regression. The results for the nine chromatographic systems evaluated are presented in Table 1 (the model system constants) and Fig. 4 (the beta coefficients to compare the relative contributions of each term to the model). Fig. 4a presents the LSER models obtained for Lux Cellulose-1 CSP with MeOH, EtOH and 2PrOH. In Fig. 4b, the models obtained with Chiralpak AD-H with MeOH, EtOH, 2PrOH, 1PrOH, BuOH and MeEt are presented. Before to comment on these results, we must point out that they may be somewhat different from previously published models of retention, due to the change in calculation method (PLS

regression versus classical multiple linear regression used previously). The models published in [5,6] are also presented in Table 1, for the purpose of comparison. It can be seen that the statistical significance of the model was comparable to previously published models with an average R^2 of about 0.8, indicating that about 80% of the variance is represented by this model. Judging from the complexity of the chiral selectors, we consider these results as reasonably good.

The main interactions contributing to retention on Lux Cellulose-1 in all conditions are π - π interactions (e term) and hydrogen-bonding with proton donors (a term), followed by dipole-dipole interactions (s term) and hydrogen bonding with proton acceptors (b term). Flexibility (f term) has a negative influence on retention while other terms related to size and shape (v and g) are of little significance as the error bars are larger than their values.

On Chiralpak AD-H, the situation is a little different as the e term is reduced while the s term is increased. However, it is known that there is some correlation between these terms as both encode some van der Waals interactions (*vide infra*). This is certainly the reason why, in previously published models (Table 1), the s term was not found significant, because classical multiple linear regression is less capable than PLS regression to deconvolute the terms that are somewhat correlated. We have pointed out in the past that it often made more sense to consider both terms together [26]. Indeed, in Table 1, it can be seen that the e and s terms in the present models sum up to a value that is approximately the same as the e value in previously published models. Also on the amylose column, hydrogen bonding with proton acceptors (b term) and the negative influence of flexibility (f term) are both more significant than on the cellulose phase. Other terms related to size and shape (v and g) are again of little significance as the error bars are larger than their values.

These models obtained on both columns are in accordance with chemical sense as the dominant features (e , s , a and b terms) are associated to interactions with the aromatic ring, $\text{C}=\text{O}$ and $-\text{NH}$ groups of the phenylcarbamate ligands.

3.2.1.1. Effect of linear alkyl chain length of the alcohol modifier. In Fig. 4, minor coefficient variations can be observed between the different alcohol modifiers to explain the retention. On a closer look and also with the help of Table 1, some general trends can be

Table 1

The system constants obtained from Eq. (1) based on PLS regression for Lux Cellulose-1 (LC1) and Chiralpak AD-H (AD).

Stationary phase and modifier	System constants								Statistics		
	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>n</i>	<i>R</i> ²	SE
LC1 MeOH	−0.60	0.56	0.16	0.73	0.05	0.07	−0.12	−0.12	144	0.83	0.17
[6]	−0.88	0.70		0.64	0.28		0.05	−0.04	191	0.88	0.15
LC1 EtOH	−0.68	0.50	0.23	0.88	0.19	0.05	−0.12	−0.09	144	0.83	0.19
LC1 2PrOH	−0.73	0.53	0.28	1.09	0.30	0.05	−0.09	−0.13	144	0.84	0.21
AD MeOH	−1.07	0.33	0.34	0.65	0.43	0.09	−0.19	0.05	145	0.80	0.19
[8]	−0.76	0.73		0.72	0.34			−0.16	208	0.84	0.20
AD EtOH	−1.20	0.35	0.36	0.72	0.46	0.08	−0.22	0.07	145	0.82	0.19
AD 2PrOH	−1.14	0.36	0.37	0.72	0.47	0.09	−0.22	0.06	145	0.79	0.21
AD 1PrOH	−1.36	0.41	0.40	0.85	0.52	0.08	−0.26	0.11	145	0.85	0.20
AD BuOH	−1.28	0.38	0.38	0.79	0.49	0.07	−0.25	0.10	145	0.85	0.19
AD MeEt	−1.20	0.37	0.37	0.75	0.48	0.09	−0.23	0.07	145	0.83	0.20

n is the number of solutes considered in the regression. *R*² is the correlation coefficient. SE is the standard error in the estimate.

observed when the alcohol linear chain length is increased (comparing MeOH, EtOH, 1PrOH and BuOH):

- Decrease in the contribution of π – π and/or dipole–dipole interactions (*e* or *e* + *s* coefficients decrease).
- Increase in hydrogen bonding with acids on both columns (*a* coefficient increases). Hydrogen bonding with bases (*b* coefficient increases) also increases significantly on Lux Cellulose-1 and less significantly on Chiralpak AD-H.

We will focus our interest on the most significant variations of the *e* + *s* and *a* coefficients. The interactions related to the *e* and *s* coefficients are sometimes difficult to explain because they

may comprise different effects. The *E* descriptor is related to the “excess polarizability” (i.e. “polarizability in excess as compared to an alkane with identical molecular volume”) of the analyte, thus the *e* coefficient models the interactions related to π and non-binding electrons. Most often, *e* is simply related to π – π interactions. We have often pointed out that it also reflects dispersive interactions (London-type interactions), for example between polarizable analytes and alkyl chains of a stationary phase [32]. However, the *e* term may also comprise interactions between a dipole component of the stationary or mobile phase and a polarizable analyte (Debye-type interactions). The *S* descriptors essentially reflects the presence of dipoles in the analyte thus the *s* coefficient may also reflect interactions between a dipole in the analyte and a

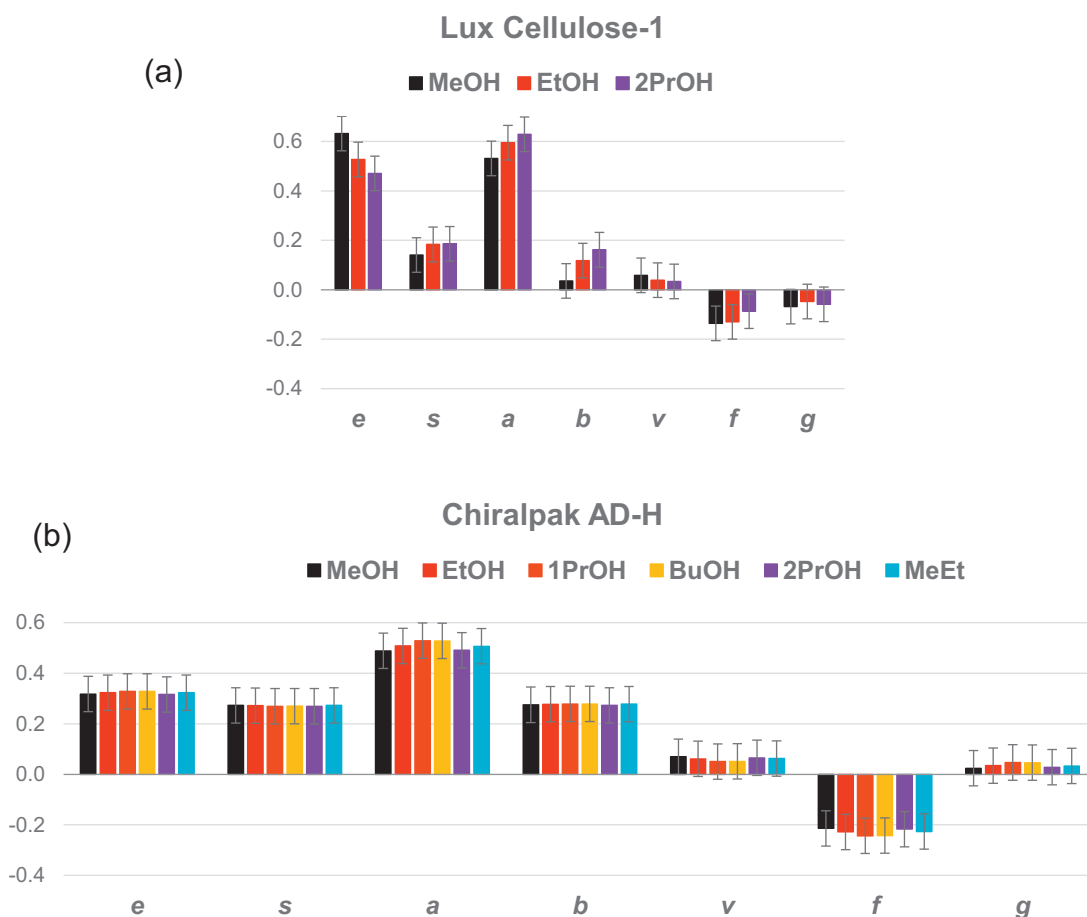


Fig. 4. The beta coefficients (*e*, *s*, *a*, *b*, *v*, *f* and *g*) issued from the multiple linear regression analysis on the 2 columns with different compositions of mobile phase. Each bar represents the contribution of a given interaction to retention (see text for details). (a) Lux Cellulose-1 and (b) Chiralpak AD-H.

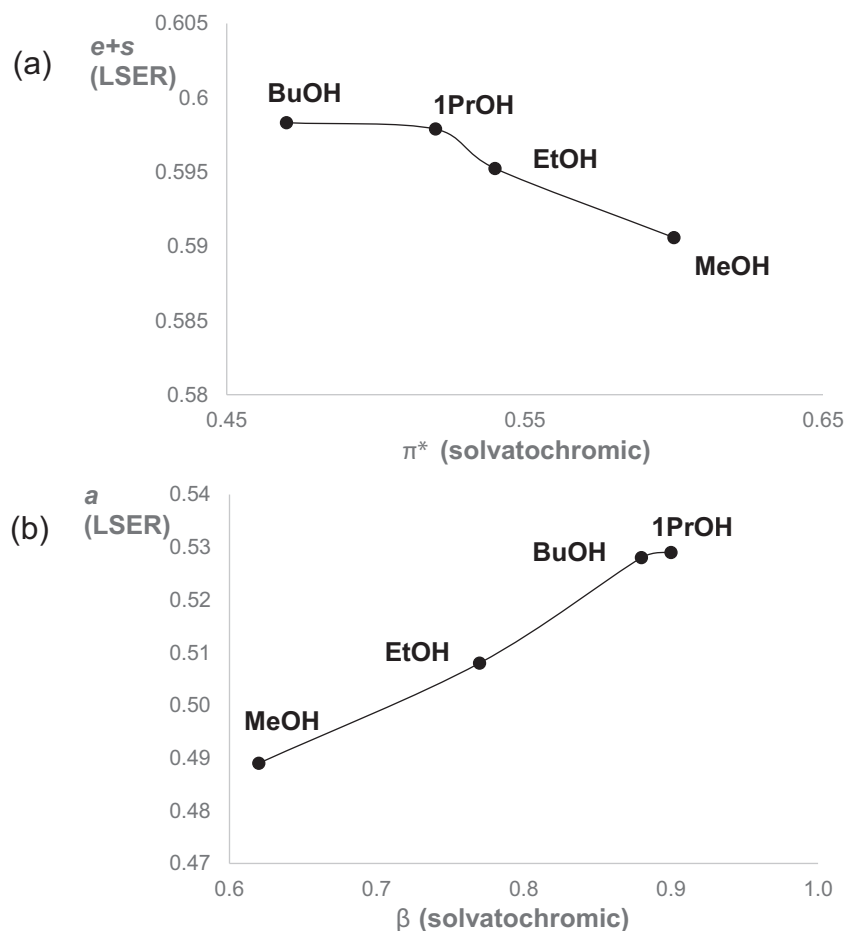


Fig. 5. Relation between LSER system constants measured on Chiralpak AD-H (Table 1) and solvatochromic parameters of the co-solvents (Table 2). (a) Characteristics related to polarity and (b) characteristics related to hydrogen bonding. The trend lines were plotted to guide the eye.

polarizable component of the stationary or mobile phase (Debye-type interactions). The third form of Van der Waals interactions, occurring between two permanent dipoles (Keesom-type interactions) is normally encoded in the s coefficient.

To compare the polarity of the four linear alcohols, we can rely on solvatochromic parameters (Table 2) [33]. It can be observed that polarity/polarizability of the alcohol solvent reflected by the π^* solvatochromic parameter increases in the following order: BuOH < 1PrOH < EtOH < MeOH. It is reasonable to assume that the most polar solvent would be a better solvent for polar analytes, thus the e and s coefficients should decrease when polarity increases as interactions with a polar mobile phase should favour faster elution. This is in accordance with the observed variation of $e+s$ in Fig. 5a.

The variations of the a coefficient can be equally compared with the properties revealed by solvatochromic parameters. The a coefficient is related to hydrogen bonding interactions

between proton-donor analytes and proton-acceptor stationary phase groups and mobile phase components. The proton-acceptor character of the alcohol is reflected through the β solvatochromic parameter and increases in the following order: MeOH < EtOH < BuOH < 1PrOH. Following the same reasoning as above, it would be reasonable to expect that interactions between proton donors (acidic analytes) and mobile phase should be improved when the basic character of the alcohol modifier increases. In other words, the a coefficient should decrease when the β solvatochromic parameter increases. However, the contrary is observed, as appears in Fig. 5b.

Thus for a -type interactions, the trend observed cannot be related to improved solvation capabilities of the alcohol solvent. On the contrary, improved interaction capabilities result in increased retention. The only reasonable way to account for this observation is to consider that there are solvent molecules adsorbed in the stationary phase participating to the retention process. Thus changing the interaction properties of the solvent is changing the retention properties of the stationary phase. Extensive adsorption of modifier molecules on silica and bonded-silica stationary phases was measured more than twenty years ago [23]. Besides, our observations are in accordance with other cases we have observed before, in achiral SFC with porous graphitic carbon or 2-ethylpyridine stationary phases [26].

It is however unclear whether the retention interactions are improved because the analytes would interact with adsorbed mobile phase components, or because adsorbed mobile phase components promote the polar compounds solubility and the ability

Table 2

Solvatochromic parameters for the five alcohols tested in this study.

Modifier	π^*	α	β
MeOH	0.60	0.93	0.62
EtOH	0.54	0.83	0.77
1PrOH	0.52	0.78	0.90
BuOH	0.47	0.79	0.88
2PrOH	0.48	0.76	0.95

Values taken from Ref. [34].

π^* is the bulk phase polarity/polarizability; α and β are the bulk phase H bond acidity and basicity respectively.

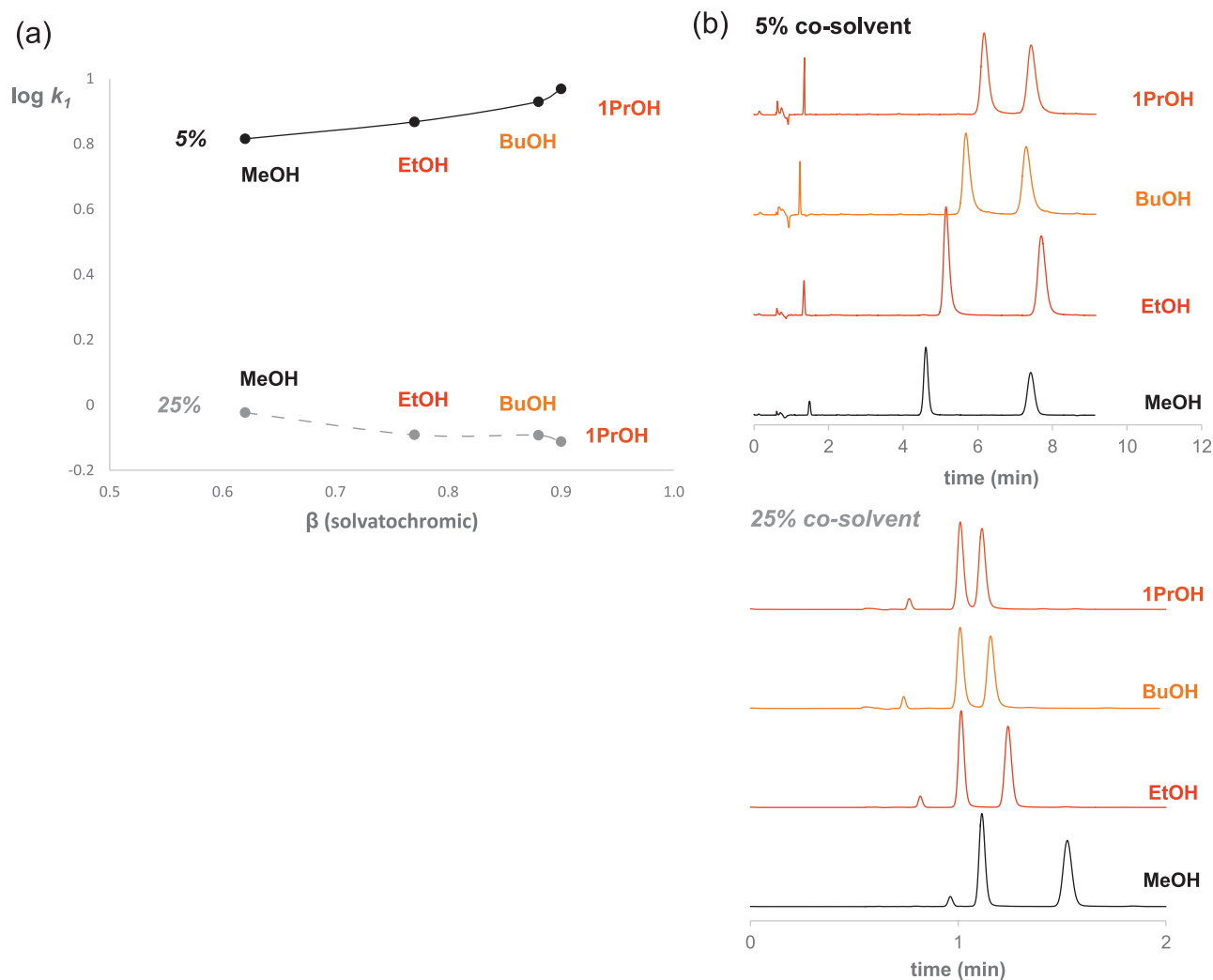


Fig. 6. Variations of retention of flurbiprofen enantiomers with mobile phase composition on Chiralpak AD-H. (a) Reversal of retention trend with basic character assessed with solvatochromic parameters (Table 2) and (b) chromatograms obtained at two levels of modifier concentration. Other conditions: 25 °C, 150 bar backpressure, 3 mL min⁻¹.

to establish strong H-bonding with the polymer carbamate groups [34]. Additionally, Kasat et al. showed that changing solvent polarity induces a reorganization of the polymer helical rods, leading to modify the distribution of the H-bonding states of the polymer C=O and NH groups [34]. It is thus possible that the three-dimensional structure of the chiral stationary phase is affected by the alcohol solvent, leading to different accessibility to the carbamate functional groups.

3.2.1.2. Variation of modifier concentration: adsorption effects. To complete the above observations related to the adsorption of mobile phase components on the stationary phase, we wished to observe the possible variations occurring when the proportion of modifier was increased. Because it seemed unreasonable to carry out the whole set of experiments (171 achiral compounds and 97 racemates) for all four alcohols in different proportions, we selected a few racemates from different compound families to explore the variations of interactions. This short selection of racemates was analyzed for the four linear alcohols and 2PrOH at 5, 10, 15, 20 and 25% in the mobile phase.

For instance, an acidic compound, flurbiprofen, was selected to observe the changing effect of hydrogen-bonding with proton donors. Fig. 6a shows the variation of retention of the first eluted enantiomer depending on mobile phase basicity (β solvatochromic parameter) at the extreme compositions of 5 and 25% modifier. It

can also be seen on the chromatograms in Fig. 6b that retention increases with basicity of the solvent when the proportion of modifier is low, while retention decreases when basicity increases at high proportion of modifier. These observations are in accordance with previous observations on porous graphitic carbon [28]. This reversal of trend can be interpreted as follows:

- When the percentage of modifier is low (typically up to 10–15%), adsorption of mobile phase components on the stationary phase is most significant. Changing one solvent by another essentially affects analyte–stationary phase interactions thus affects retention.
- When the percentage of modifier is high (above 15–20%), the stationary phase is probably saturated with mobile phase components. Changing one solvent by another essentially affects analyte–mobile phase interactions more than analyte–stationary phase interactions, thus affects elution.

The variations of enantioseparation factor with modifier proportion and nature are discussed later in this paper.

3.2.1.3. Comparison between linear and branched alcohols. On both columns, 2PrOH did not produce a different retention pattern (Fig. 4) from the linear alcohols.

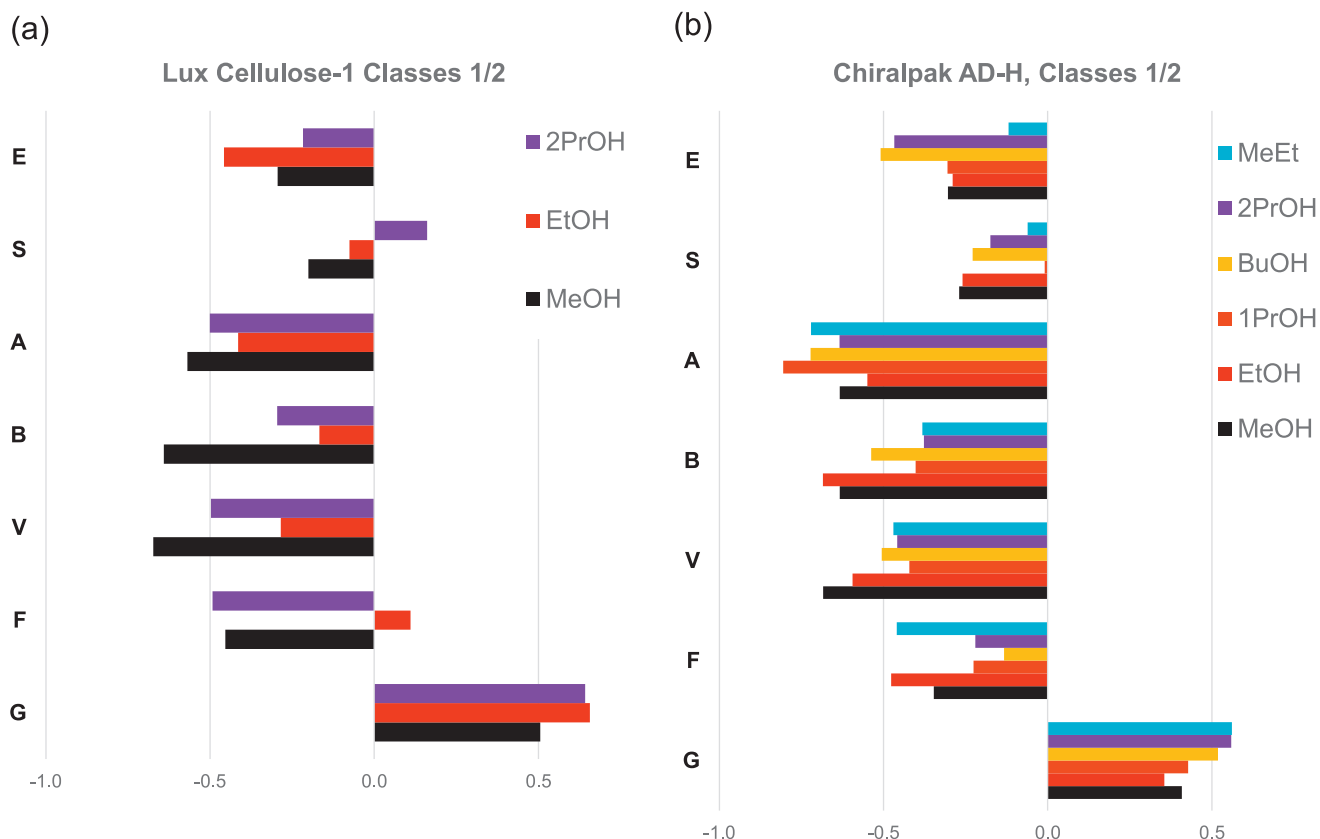


Fig. 7. Discriminant analysis between early eluting and late eluting racemates using the seven molecular descriptors. Negative features are common to early eluting racemates (Class 1), positive features are common to late eluting racemates (Class 2) on (a) Lux Cellulose-1 and (b) Chiralpak AD-H.

Wang et al. already displayed that the incorporation of branched alcoholic modifier can possibly alter the glycosidic linkage between the glucose units, leading to different degrees of twisting in the helical structure [35]. Here, the carbamate function might be more or less available as a hydrogen-donor and -acceptor through the carbonyl and $-\text{NH}-$ groups, explaining why 2PrOH does not fit with the trends of hydrogen bonding observed above for the linear alcohols.

3.2.1.4. Solvent mixture methanol–ethanol. When MeEt dual co-solvent system is used, the beta coefficients observed in Fig. 4 are intermediate between the coefficients observed for MeOH alone or EtOH alone. This is in accordance with the clustering observed in Fig. 3a.

3.2.2. Separation properties characterized with discriminant analysis

We have described in previous works that the above descriptors (E, S, A, B, V, F and G) can also be used to describe enantioseparation processes with the help of discriminant analysis (DA). Firstly, the racemates analyzed can be divided into two classes for each CSP/MP system: one class is defined as “separated” ($\alpha > 1$) while the other one is described as “not separated” ($\alpha = 1$). Then, because the reasons for the racemates to be separated are not the same to all, we have suggested that each class could be further divided into two classes, based on the comparison of their retention to the retention that could be predicted based on Eq. (1). In the case of Chiralpak AD-H, we have pointed out before that the high success rate observed on this column makes it difficult to obtain significant statistics if the testing set of racemates must be divided into classes. In particular, most compounds that are not separated elute before the expected retention (based on the prediction calculated with Eq. (1)). There

are often no more than 4 racemates in our set that are not separated but eluted later than the prediction. In this case, meaningful models cannot be expected. For the purpose of simplifying the discussion, we have chosen here to focus our attention on the following classes of racemates:

- (i) Class 1 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).
- (ii) Class 2 comprises racemates that were “separated” ($\alpha > 1$) but eluted after their predicted retention, based on Eq. (1).
- (iii) Class 3 comprises racemates that were “not separated” ($\alpha = 1$) but eluted before their predicted retention, based on Eq. (1).

Then two different 2-class DA were computed:

- (i) Class 1 vs. Class 2 indicates the features that are responsible for a compound to elute earlier or later than predicted thus may indicate the reasons for heterogeneous behaviour.
- (ii) Class 1 vs. Class 3 indicates the features that are common to successfully resolved racemates among early eluting compounds.

The results are represented in Figs. 7 and 8. The interpretation of DA results usually lies in barycentre plots (position of the centres of gravity for each class of enantiomers on an axis) and loading plots (contribution of each solute descriptor to enantioseparation). Bar chart is a pedagogic and better way of demonstrating our results. To compare less and more retained racemates (classes 1/2 in Fig. 7), the descriptor's bars that point to the left-hand side (negative values) indicate structural features that are common to less retained racemates while those pointing to the right-hand side (positive values) indicate structural features that are common to more retained racemates. To compare separated and non separated racemates

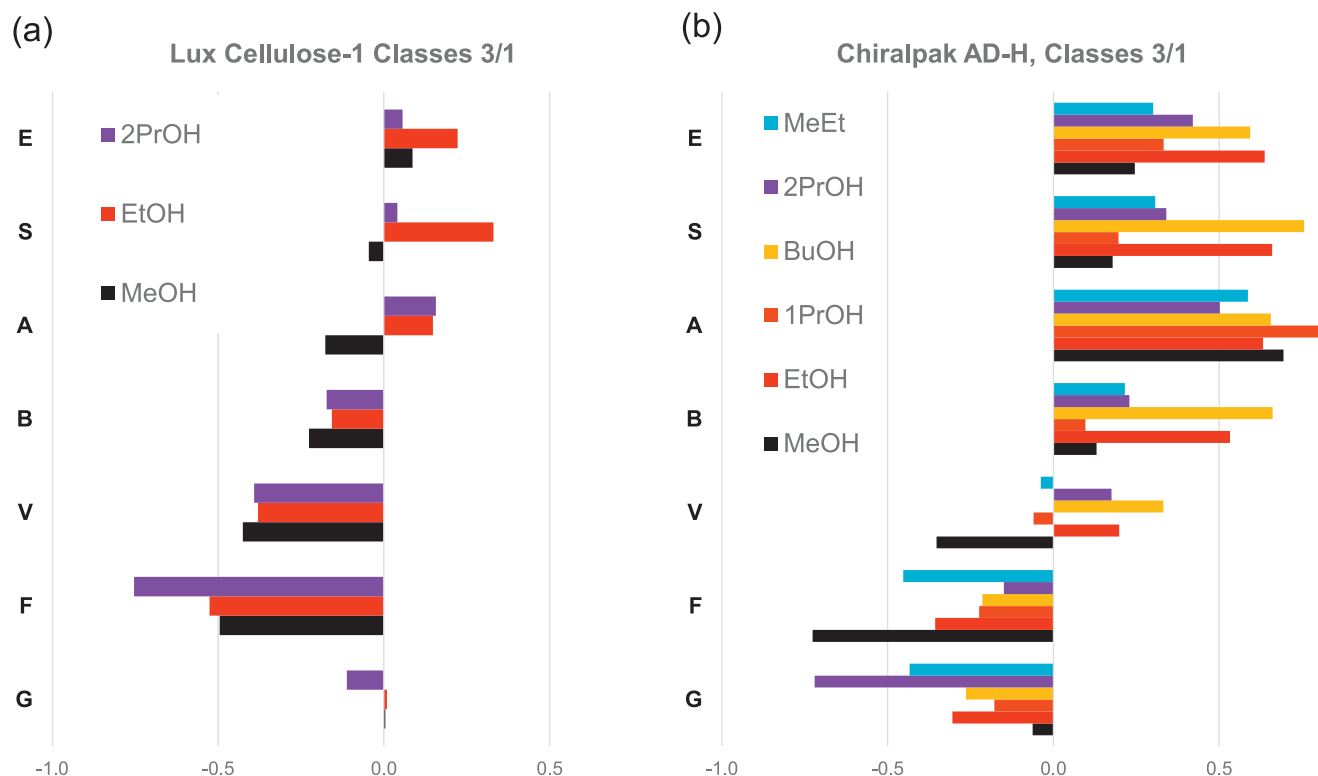


Fig. 8. Discriminant analysis between separated and non separated racemates using the seven molecular descriptors. Negative features are common to non separated racemates (Class 3), positive features are common to separated racemates (Class 1) on (a) Lux Cellulose-1 and (b) Chiralpak AD-H.

(classes 3/1 in Fig. 8) the descriptor's bars that point to the left-hand side (negative values) indicate structural features that favour co-elution of the enantiomers while those pointing to the right-hand side (positive values) indicate structural features that would favour enantioseparation.

First of all, in accordance with our previous observations, it is clear from Fig. 7 that early eluting and lately eluting compounds all share a common pattern on both columns: lately eluting racemates are rather small and spherical molecules as large molecules preferably elute early (the V descriptor is pointing to the left) and globular molecules preferably are more retained (the G descriptor is pointing to the right). We had also noted before that the other structural features responsible for interaction capability (polarity, polarizability, hydrogen bonding capacity) are all pointing to the group of early eluting racemates. This leads the following interpretation: early eluting racemates are rather large molecules that cannot enter certain small cavities in the stationary phase, while lately eluting racemates are smaller thus encounter less steric resistance to insertion in the said cavities. Besides, lately eluting racemates are rather spherical, possibly allowing them to better fit on the walls of the cavities than flat or rod-like molecules (small G values) could do.

Secondly, it can be observed from Fig. 8 that all non-separated racemates on both columns have one feature in common: their high flexibility (the F descriptor is pointing to the left in all cases). Indeed we had pointed out in previous works that flexibility generally appears to be the least helpful feature for enantiorecognition because flexible molecules are more adaptable to CSP cavities, which somewhat dilutes discrimination between enantiomers.

Other features appear to differ between the two columns and vary between the different solvents. Regarding the enantioseparation mechanism, the results of DA for classes 3/1 are obviously the most interesting thus we will focus our attention in Fig. 8.

3.2.2.1. Cellulose-type chiral stationary phase. Fig. 8a presents DA bar charts comparing separated and non-separated racemates (classes 3/1) for each mobile phase composition on Lux Cellulose-1. The following general trends are identified:

- (i) For the early eluting racemates, the acidic character does not promote the separation using methanol as modifier (A descriptor bar pointing to the left), contrary to the other two alcohols tested (A descriptor bar pointing to the right). For instance, 4',5,7-trihydroxyflavonone has three proton donor groups thus a large A value (1.30). In presence of ethanol and 2-propanol, the separation is favoured by hydrogen bonding (with separation factors of 1.16 and 1.18, respectively) while no enantioseparation is observed with methanol.

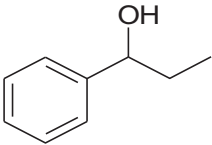
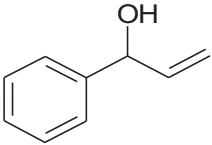
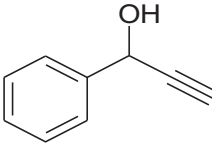
Racemates with no proton-donor capability show less discrepancies when changing of co-solvent. This is well-illustrated with the analysis of 6-methoxyflavonone, having a similar skeleton compared to 4',5,7-trihydroxyflavonone without the proton donor ability: the separation factors measured with methanol, ethanol and 2-propanol are 1.16, 1.16 and 1.18 respectively.

Another example is that of styrene oxide (1,2-epoxyethylbenzene) and phenylethanol. The former has separation factors of 1.23, 1.06 and 1.08 with methanol, ethanol and 2-propanol respectively; while the latter has separation factors of 1.21, 1.23 and 1.10. Thus opening the epoxy functional group in a proton-donor hydroxyl group is rather favourable to enantioseparation with ethanol and isopropanol, but not so much with methanol.

- (i) In classes 1/3, racemates showing high polarity and polarizability (E and S values) increase the probability of separation. An example can be found in Table 3 where the separation factors measured for three racemates essentially differing in their

Table 3

Effects of polarity and polarizability on enantioseparation on Lux Cellulose-1.

Compound	Structure	Molecular descriptors		Separation factors		
		E	S	MeOH	EtOH	2PrOH
1-Phenyl-1-propanol		0.775	0.83	1.22	1.24	1.12
Phenylvinylcarbinol		0.930	0.89	1.35	1.40	1.21
1-Phenyl-2-propyn-1-ol		1.060	1.00	1.38	1.47	1.39

polarity and polarizability features are gathered. It can be seen there that the large E and S values on 1-phenyl-2-propyn-1-ol yield larger enantioseparation factors than on phenylvinylcarbinol, which in turn has larger enantioseparation factors than 1-phenyl-1-propanol.

- (ii) The effects of shape are slightly different as globularity is not favourable to enantioseparation with 2-propanol but not significant with the other two modifiers. It is possible that the bulky isopropyl group of adsorbed 2-propanol molecules would limit the access to the chiral cavities.

3.2.2.2. Amylose-type chiral stationary phase. In Fig. 3b, methanol and methanol–ethanol were clustered apart from the other alcohol modifiers for Chiralpak AD-H. In Fig. 8b, it appears that methanol provides different patterns from the other co-solvents, with some aspects of these patterns also observed for methanol–ethanol. The adsorption of modifier affects the arrangement of the polymer rods [34] and causes some swelling of the stationary phase. Changes in the local microenvironment of the glycosidic linkages or polymer side chain mobility and twist of the CSP helix have been reported [35].

The general trends observed are described below.

- (i) Whatever the co-solvent, flexibility and globular shapes (F and G) are not favourable to enantioseparation for early eluting racemates. The former was already mentioned above as a common feature observed on all CSP, while the latter is in accordance with the above observation that early eluting compounds are rather flat molecules. Besides, some tendency towards a more negative effect of globularity depending on alkyl chain length can be observed. We can also point out that 2-propanol again shows a significantly larger negative value for the G term. Both observations again suggest that adsorbed alcohol molecules may cause some steric resistance to insertion of globular molecules in the chiral cavities, particularly when the alkyl chain length is bulky.
- (ii) The effects of size are not consistent when changing the alcohol co-solvent: methanol favours small molecules (V term pointed to the left) while for other solvents, size is either not significant or they favour large molecules (V term pointed to the right). An example is provided with the comparison of separation factors observed for 2-phenylpropionic acid and 2-phenylbutyric

acid. The difference in these two racemates is essentially a difference in molecular volume as the alkyl chain is longer on the latter, while other interaction capabilities are little affected. With all alcohol solvents, a larger enantioseparation factor was observed on the largest molecule (2-phenylbutyric acid) apart from methanol that provided a larger enantioseparation factor on the smallest molecule. The same observations can be made comparing methyl-phenyl-sulfoxide and methyl-*p*-tolyl-sulfoxide.

- (iii) Hydrogen bonding with proton donors and proton acceptors (A and B terms) is favourable to enantioseparation with all co-solvents tested. No particular trend appears with alkyl chain length of the alcohol modifier.
- (iv) Polarity and polarizability (E and S terms) are favourable to enantioseparation with all co-solvents tested, with no clear trend related to alkyl chain length of the alcohol modifier. Several examples can be found to illustrate this point. For instance: methylphenylsulfoxide compared to phenylvinylsulfoxide, or hexobarbital (non aromatic) compared to mephobarbital (aromatic), as the seconds were always better resolved than the firsts.

What about the comparison between a single (methanol or ethanol) and dual co-solvent (methanol–ethanol 50:50) system. Lazarescu et al. successfully applied a mixture of methanol and 2-propanol for preparative purposes, showing better efficiency and orthogonal selectivity than single modifiers [36]. In our case, the benefits of mixing two solvents were not significant, as appeared in Fig. 1. However, we were curious to see if the separation mechanism may be affected. It has been demonstrated that mixtures of linear alcohols in non-polar solvents undergo OH–OH self-association to form cyclic tetramers, decreasing the adsorption efficiency of solvent molecules [37–39]. Judging from the DA patterns in Figs. 7 and 8 and from the direct comparison of enantioseparation factors, no such conclusion could be drawn with our set of data.

3.2.2.3. Effects of modifier proportion on enantioseparation. As indicated above, we had selected a few racemates from different compound families to explore the effects of alcohol proportion in the mobile phase, from 5 to 25% (5, 10, 15, 20 and 25%). Because Chiralpak AD-H had been fully characterized with a larger number

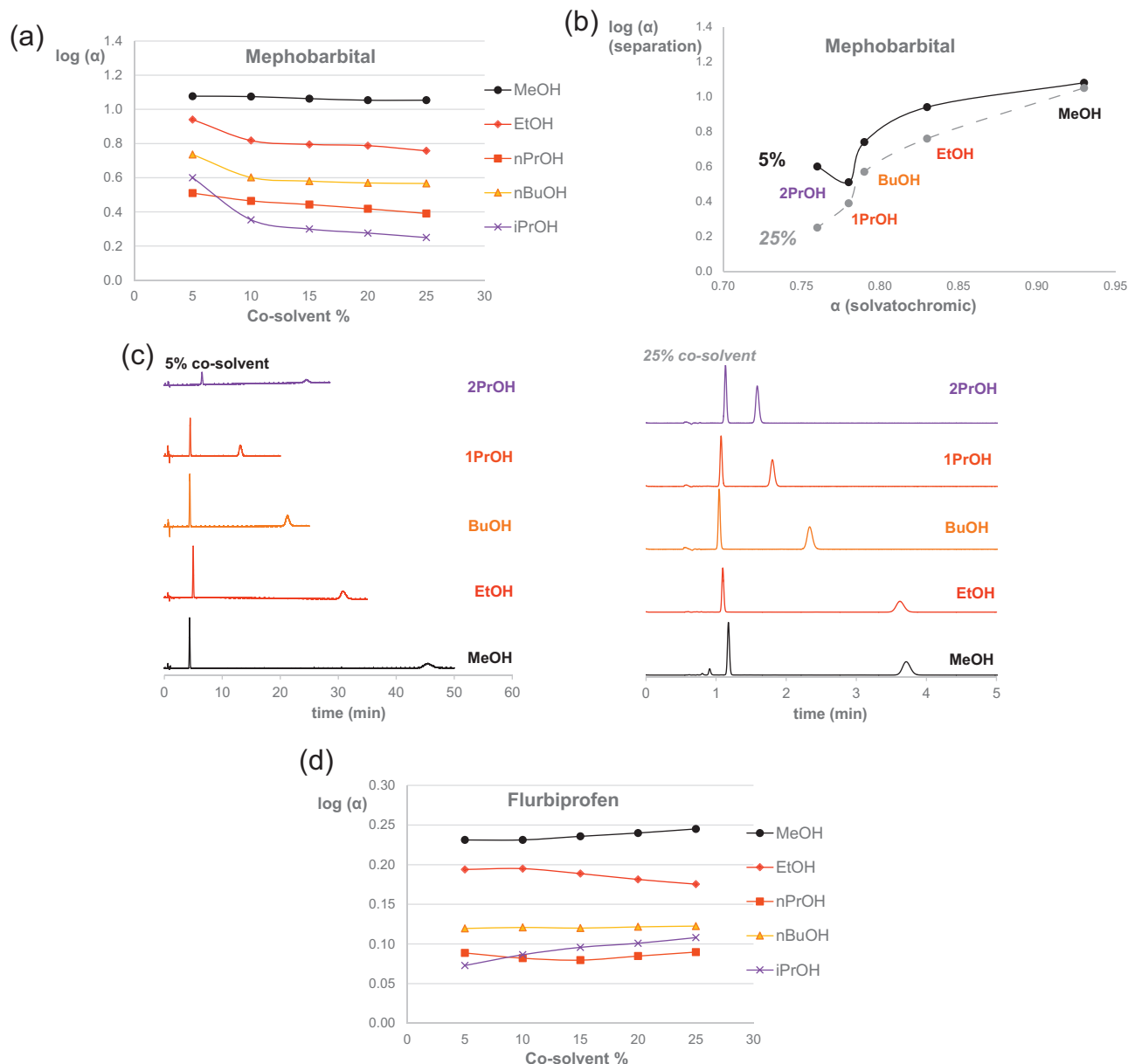


Fig. 9. Variations of enantioseparation of (a–c) mephobarbital and (d) flurbiprofen enantiomers with mobile phase composition on Chiralpak AD-H.

of mobile phase compositions, only this column was further retained for the study of alcohol proportion effect. As it seemed unreasonable to analyze the whole set of racemates in all mobile phase compositions of interest (five alcohols \times five alcohol proportions \times 97 racemates would require 2425 experiments), a reduced set of racemates was selected to scan different interaction capabilities (π – π , dipole–dipole, hydrogen bonding with acids and bases). In addition, we selected only racemates that provided a good resolution in the initial conditions (10% co-solvent) to ensure that any variation due to alcohol proportion would be measurable.

First of all, it could be observed that enantioseparation factors were only slightly affected by the increase in modifier proportion. Besides, to most analytes in this testing set, the most significant changes were observed between 5 and 10% modifier, while the slopes of α vs. modifier proportion were smaller between 10 and 25% modifier. Following the above comments on modifier absorption on the stationary phase, this observation makes sense as the adsorption of mobile phase components is bound to cause significant changes in the smallest proportions of modifier

thus have an effect on enantioseparation. Upon further increasing the alcohol concentration, adsorption of modifier is less significant while eluting strength is improved, but this should have no effect on the enantiorecognition mechanism. The variations can be observed in Fig. 9a and b, with the enantioseparation factors measured for mephobarbital plotted against (a) modifier proportion and (b) the acidity of alcohol expressed by the α solvatochromic parameter. Note that mephobarbital is represented here as a representative example of the tendencies observed for most racemates tested. General conclusions reflected by this sample racemate are as follows: (i) enantioseparation decreased when the modifier proportion was increased with all solvents and (ii) enantioseparation factors were generally increasing with the acidic character of alcohol modifier or increasing with decreasing basic character (expressed by the β solvatochromic parameter, figure not shown). A notable exception to this latter rule is that of isopropanol in small proportion (5%) that sometimes exhibited abnormally large enantioseparation factors, as appears in Fig. 9b and in the chromatograms in Fig. 9c. The reasons for larger

enantioselectivity values with short-chain alcohols are unclear. Two hypotheses can be suggested: first, we may infer that improved accessibility to the chiral cavities may again participate in favourable steric fit. Second, different hydrogen-bonding capabilities of the alcohol mobile phase components may induce different local conformation changes in the amylose chain, by relaxing of the carbonyl group as demonstrated by Ma et al. [40].

The trends observed with flurbiprofen in Fig. 9d, however, indicate that other mechanisms may be participating. Flurbiprofen clearly singled out from the other racemates we had selected at this step, but it was the only acidic compound in the short list. Indeed, in this case it appears that enantioseparation factors can also increase when the proportion of alcohol is increased. It does not follow that enantioresolution should also increase, because the significant decrease of retention (together with the small variations of column efficiency) was detrimental to resolution. However, the variety of observed trends in this case (positive slopes, negative slopes of U-shaped curves) is rather puzzling and raises new questions. More experiments are necessary to answer them.

4. Conclusion

In the present paper, we have tried to provide a better understanding of the effects of mobile phase composition on retention and enantioseparation with polysaccharide stationary phases. We shall summarize the major observations as follows. (i) Enantioseparation was improved with short-chain alcohols on the amylose phase but degraded on the cellulose phase (Fig. 1b). (ii) Methanol usually provided the largest success rate and specificity (Figs. 1a and 2). (iii) Changing the solvent nature has comparable effects on retention on the two chiral selectors tested here (Fig. 4), but different effects on the separation capabilities (Fig. 8). In accordance with our previous observations in achiral SFC, the adsorption of mobile phase components contributed significantly to retention and separation (Figs. 5, 6 and 9).

Acknowledgements

Waters is greatly acknowledged for the Acquity UPC² system let at our disposal. We are very grateful to Phenomenex (Magali Dupin and Tivadar Farkas) for a kind gift of the Lux Cellulose-1 columns. Yingru Zhang (Bristol-Myers Squibb) is acknowledged for the gift of columns, and for his support in all matters.

References

- [1] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 336–345.
- [2] H. Nelander, S. Andersson, K. Öhlén, Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9397–9405.
- [3] J. Samuelsson, R. Arnell, T. Fornstedt, Potential of adsorption isotherm measurements for closer elucidating of binding in chiral liquid chromatographic phase systems, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1491–1506.
- [4] C. West, G. Guenegou, Y. Zhang, L. Morin-Allory, Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography. II. Factors contributing to enantiomer separation on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) of amylose and cellulose stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2033–2057.
- [5] C. West, Y. Zhang, L. Morin-Allory, Insights into chiral recognition mechanisms in supercritical fluid chromatography. I. Non-enantiospecific interactions contributing to the retention on tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) amylose and cellulose stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2019–2032.
- [6] S. Khater, Y. Zhang, C. West, In-depth characterization of six cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1303 (2013) 83–93.
- [7] S. Khater, Y. Zhang, C. West, Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography. IV. Chlorinated polysaccharide stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 294–310.
- [8] S. Khater, Y. Zhang, C. West, Insights into chiral recognition mechanism in supercritical fluid chromatography. III. Non-halogenated polysaccharide stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 278–293.
- [9] M. Lämmerhofer, Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814–856.
- [10] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 211–217.
- [11] J.L. Gohres, A.T. Marin, J. Lu, C.L. Liotta, C.A. Eckert, Spectroscopic investigation of alkylcarbonic acid formation and dissociation in CO₂-expanded alcohols, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 1302–1306.
- [12] R.R. Weikel, J.P. Hallett, C.L. Liotta, C.A. Eckert, Self-neutralizing in situ acid catalysis for single-pot synthesis of iodobenzene and methyl yellow in CO₂-expanded methanol, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 5252–5257.
- [13] B. Su, Z. Bao, H. Xing, Y. Yang, Q. Ren, Enantioseparation of paroxetine intermediate on an amylose-derived chiral stationary phase by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5140–5146.
- [14] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J. Bernal, M.T. Martín, Study of the enantiomeric separation of an acetamide intermediate by using supercritical fluid chromatography and several polysaccharide based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4886–4891.
- [15] Y. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, P. Sandra, Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 157–166.
- [16] M.A. Lindskog, H. Nelander, A.C. Jonson, T. Halvarsson, Delivering the promise of SFC: a case study, *Drug Discov. Today* 19 (2014) 1607–1612.
- [17] D.V. McCalley, The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858–880.
- [18] K. De Klerck, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, Exploratory data analysis as a tool for similarity assessment and clustering of chiral polysaccharide-based systems used to separate pharmaceuticals in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 110–124.
- [19] L. Miller, Evaluation of non-traditional modifiers for analytical and preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 261–266.
- [20] J.O. DaSilva, B. Coes, L. Frey, I. Mergelsberg, R. McClain, L. Nogle, C.J. Welch, Evaluation of non-conventional polar modifiers on immobilized chiral stationary phases for improved resolution of enantiomers by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 98–103.
- [21] C.F. Poole, Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 157–171.
- [22] A. Tarafder, K. Kaczmarek, M. Ranger, D.P. Poe, G. Guiochon, Use of the isopycnic plots in designing operations of supercritical fluid chromatography. IV. Pressure and density drops along columns, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 132–145.
- [23] J.R. Strubinger, H. Song, J.F. Parcher, High-pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 2. Binary isotherms of carbon dioxide and methanol, *Anal. Chem.* 63 (1991) 104–108.
- [24] N. Bargmann-Leyder, A. Tambuté, M. Caude, A comparison of LC and SFC for cellulose- and amylose-derived chiral stationary phases, *Chirality* 7 (1995) 311–325.
- [25] J.A. Blackwell, R.W. Stringham, Characterization of temperature dependent modifier effects in SFC using linear solvation energy relationships, *Chromatographia* 46 (1997) 301–308.
- [26] C. West, E. Lesellier, Effects of mobile phase composition on retention and selectivity in achiral supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 152–162.
- [27] J.A. Blackwell, R.W. Stringham, Comparison of various bulk fluids and modifiers as near-critical mobile phases on a polymeric column using linear solvation energy relationships, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 631–637.
- [28] C. West, E. Lesellier, Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 64–76.
- [29] W. Ren-Qi, O. Teng-Teng, N. Siu-Choon, T. Weihua, Recent advances in pharmaceutical separations with supercritical fluid chromatography using chiral stationary phases, *Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 83–100.
- [30] M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 29–47.
- [31] C.F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 263–299.
- [32] C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model. I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 181–190.
- [33] M.H. Abraham, H.S. Chadha, R.A.E. Leitao, R.C. Mitchell, W.J. Lambert, R. Kalisz, A. Nasal, P. Haber, Determination of solute lipophilicity, as log*P*(octanol) and log*P*(alkane) using poly(styrene-divinylbenzene) and immobilised artificial membrane stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 35–47.
- [34] R.B. Kasat, Y. Zvinevich, H.W. Hillhouse, K.T. Thomson, N.-H. Linda Wang, E.I. Franses, Direct probing of sorbent–solvent interactions for amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) using infrared spectroscopy, X-ray diffraction, solid-state NMR, and DFT modeling, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 14114–14122.
- [35] T. Wang, R.M. Wenslow Jr., Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 99–110.

- [36] M.J. Vivi Lazarescu, L.Ma. Mulvihill, Poster presented at the 2nd International Conference on Packed-Column SFC in Zurich, 2009.
- [37] S. Ma, S. Shen, H. Lee, N. Yee, C. Senanayake, L.A. Nafie, N. Grinberg, Vibrational circular dichroism of amylose carbamate: structure and solvent-induced conformational changes, *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (2008) 2111–2114.
- [38] T. O'Brien, L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P.H. Toma, D.A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker, N. Grinberg, Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1999–2007.
- [39] A.N. Fletcher, C.A. Heller, Self-association of alcohols in nonpolar solvents, *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 3742–3756.
- [40] S. Ma, S. Shen, H. Lee, M. Eriksson, X. Zeng, J. Xu, K. Fandrick, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg, Mechanistic studies on the chiral recognition of polysaccharide-based chiral stationary phases using liquid chromatography and vibrational circular dichroism: reversal of elution order of N-substituted alpha-methyl phenylalanine esters, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3784–3793.

III. Comparaison des phases mobiles liquides et supercritiques

1. Introduction

La stabilité du complexe diastéréomérique formé entre un racémique et le sélecteur chiral dépend du mode chromatographique employé [2] : RPLC (« *Reversed Phase Liquid Chromatography* »), NPLC (« *Normal Phase Liquid Chromatography* »), PO (« *Polar organic* ») ou SFC.

Les premières PSC polysaccharides ont été développées pour une utilisation en chromatographie en phase normale. Aujourd'hui, d'autres phases sont développées pour les autres modes. Par exemple, le support cellulose *tris*-(3,5-dichlorophenylcarbamate) (Sepapak-5, Phenomenex) présente des capacités de reconnaissance chirale élevées dans les modes RPLC et PO, ainsi qu'en SFC comme nous l'avons montré au chapitre précédent, alors que des mélanges alcane/alcool solubilisent le dérivé cellulose et le rendent inutilisable [3]. Aujourd'hui, les fournisseurs attachent une grande importance au caractère multimodal des nouvelles PSC développées. De manière générale, les phases polysaccharides sont attractives à travers leur caractère universel. La littérature présente une multitude de références concernant l'utilisation de ces phases en milieu aqueux et non aqueux [4,5,6]. Au contraire, certains fabricants commercialisent ces phases spécifiques à un mode chromatographique donné.

Le caractère multimodal est d'autant plus intéressant avec une instrumentation hybride, comme en propose Agilent avec le système *1260 Infinity SFC/UPLC* (www.agilent.com/chem/sfc), qui met à disposition deux modes chromatographiques orthogonaux en un seul instrument. La différence d'énantiosélectivité liée à la nature de l'éluant est clairement illustrée figure 3.10.

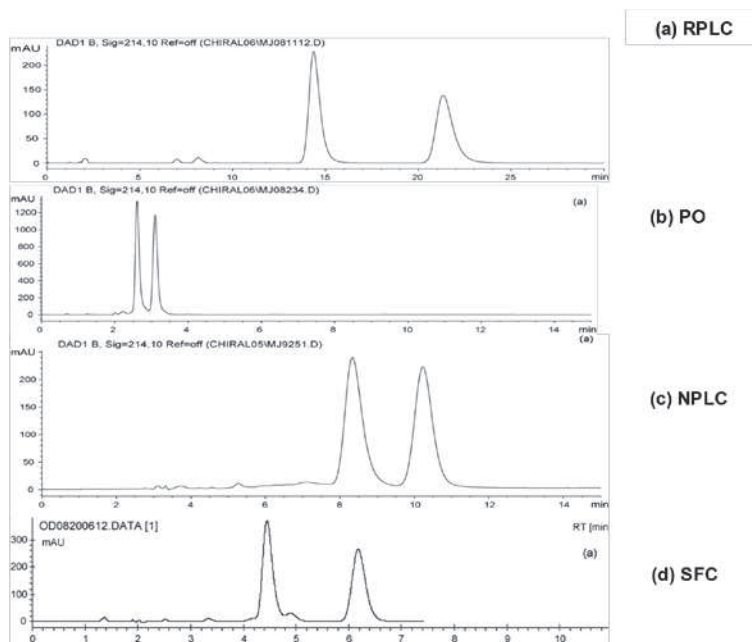


Figure 3.1 : Séparation du Nutlin-3 sur Chiralcel OD-H en (a) RPLC (acétonitrile : eau (40 :60)), (b) PO (Methanol), (c) NPLC (hexane-Ethanol (7030)) et (d) SFC (CO₂-MeOH (65 :35)) [7]

Chaque mode possède ses avantages et spécificités [3]. Le mode RPLC est une méthode de choix pour l'analyse d'échantillons biologiques (protéines, peptides, carbohydrates, lipides, vitamines, coenzymes) à travers le caractère non-aqueux de sa phase mobile. L'introduction d'additifs volatils (acide formique ou acétate d'ammonium), pour contrôler l'état de charge de la molécule d'intérêt, facilite le couplage avec la spectrométrie de masse. Cependant la majorité des séparations chirales est réalisée dans les modes NPLC, SFC et PO. Ces trois modes sont également les plus favorables au transfert de méthode à grande échelle, grâce à la facilité d'évaporation des solvants. En parallèle, la SFC est une méthode de choix vis-à-vis de la réduction du volume de solvant à évaporer [8]. De plus, dans le domaine chiral, la SFC se place comme une alternative intéressante aux méthodes existantes en NPLC. De plus en plus, les industriels font le pari d'intégrer cette technologie pour des développements de méthodes rapides et efficaces.

Cette étude compare le comportement rétentif et énantiosélectif d'un large set de composés (achiraux et racémiques) dans un éluant liquide (NPLC) et dans une phase mobile contenant majoritairement du CO₂ (SFC).

2. Résultats

2.1. Propriétés de rétention

2.1.1. Résultats préliminaires

Récemment, la caractérisation de trois phases glycopeptides macrocycliques (Chirobiotic V2, Chirobiotic T et sa forme aglycone Chirobiotic TAG) a été réalisée, par Mitchell, Berthod et Armstrong, en chromatographie liquide à polarité de phase normale (NPLC) et inversée (RPLC) [9,10]. Ces études reposent sur l'application du modèle d'Abraham (5 coefficients).

Dans le cadre de la compréhension du transfert NPLC-SFC, nous avons caractérisé ces mêmes colonnes en SFC. Le tableau 3.1 présente les constantes du système des PSC dans les différents modes chromatographiques. Il est important de souligner que l'éluant liquide utilisé est un mélange heptane/éthanol (90:10, v/v) alors que le fluide supercritique est un mélange CO₂/méthanol (90:10, v/v).

Conditions	Colonnes Phase mobile	Constantes du système						Statistiques			
		c	e	s	a	b	v	n	R ² adj	SE	F
SFC	Chirobiotic T CO ₂ /MeOH (90:10)	-1,216 0,081	0,471 0,053	0,393 0,074	1,106 0,068	1,040 0,081	-0,464 0,05	151	0,910	0,215	302
LC	Chirobiotic T Hept./EtOH (90:10)	-0,51 0,077	0,000	0,664 0,061	0,542 0,047	1,796 0,08	-0,979 0,061	46	0,980	0,112	506
SFC	Chirobiotic TAG CO ₂ /MeOH (90:10)	-1,111 0,075	0,531 0,051	0,341 0,072	1,215 0,063	0,855 0,08	-0,364 0,046	143	0,920	0,194	325
LC	Chirobiotic TAG Hept./EtOH (90:10)	-0,487	0,000	0,774	0,473	2,004	-1,014	45	0,980	0,108	568
SFC	Chirobiotic V2 CO ₂ /MeOH (90:10)	1,453 0,047	0,554 0,035	0,000	1,536 0,056	0,756 0,056	0,000	146	0,912	0,187	505

Tableau 3.1 : Constantes du système obtenues par analyse LSER sur trois PSC glycopeptides macrocycliques en SFC (nos travaux) et en NPLC [9,10].

En NPLC, le coefficient *e* est nul, ce qui indique des interactions de type π - π (ou dipôle-dipôle) équivalentes du soluté entre la PSC et la phase mobile. Ce terme *e* nul (voire négatif) est souvent observé dans les systèmes NPLC, quel que soit le support (silice, silice greffée aminopropyle ou cyanopropyle...) [11,12].

Il faut néanmoins remarquer que le terme s a augmenté, or nous avons indiqué au chapitre précédent qu'il existe une certaine covariance entre les termes e et s . De plus, les interactions de type b (liaisons hydrogène avec donneurs d'électrons) deviennent majoritaires. La capacité « donneur de proton » de la PS est donc favorisée dans le mode NPLC.

En SFC, sur Chirobiotic T, le ratio b/a indique un équilibre entre la capacité de la PS à être donneur ou accepteur de liaisons hydrogène. Sur Chirobiotic TAG, la contribution du coefficient a est légèrement plus importante.

On observe enfin que le coefficient v est négatif dans les deux modes. Ce dernier décrit les interactions dispersives. En NPLC, ce terme se présente comme très significatif pour expliquer la rétention.

Nous reviendrons sur les modèles SFC des phases glycopeptidiques un peu plus loin dans ce chapitre, lors de l'étude des additifs.

Si les études des interactions non-spécifiques indiquent un mécanisme de rétention quelque peu différent entre l'éluant liquide et le fluide supercritique, les résultats concernant l'énantiosélectivité en NPLC ne peuvent être discutés faute de données.

Pour explorer plus avant les différences entre NPLC et SFC, une étude détaillée a été réalisée sur une PSC polysaccharide à l'aide du modèle modifié des paramètres de solvation.

2.1.2. Etudes détaillées des propriétés de rétention

A travers son caractère multimodal, la phase Lux Cellulose-1 a été caractérisée en chromatographie en phase supercritique à l'aide de mélange CO₂-modificateur (méthanol, éthanol, isopropanol) comme il a été présenté dans la section précédente, comparant les effets des co-solvants, et en chromatographie liquide à polarité de phase normale en utilisant des mélanges heptane-modificateur (éthanol et isopropanol). Les conditions opératoires sont détaillées en annexe 4.

Une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été réalisée afin d'identifier les similarités/dissimilarités entre les différents systèmes chromatographiques. La CAH, figure 3.11, repose sur les logarithmes normalisés des facteurs de rétention ($\log k$) de 192 espèces non chirales. Deux clusters sont alors formés : Le mécanisme qui contrôle la rétention en

NPLC est clairement distingué par rapport à celui observé en SFC. Les capacités de rétention de Lux Cellulose-1 dépendent du mode chromatographique employé.

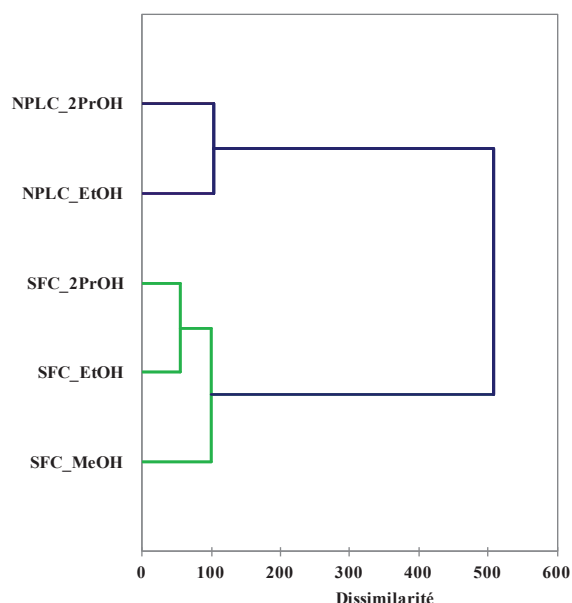


Figure 3.2 : Agglomération des systèmes chromatographiques selon leurs capacités rétentes (distance Euclidienne, agglomération selon la méthode de Ward)

Afin de comprendre l'origine des différences entre les deux modes chromatographiques, le modèle modifié des paramètres de solvation a été employé. La figure 3.12 présente les modèles LSER obtenus pour Lux Cellulose-1 en SFC et en NPLC, en utilisant l'éthanol comme modificateur. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'isopropanol.

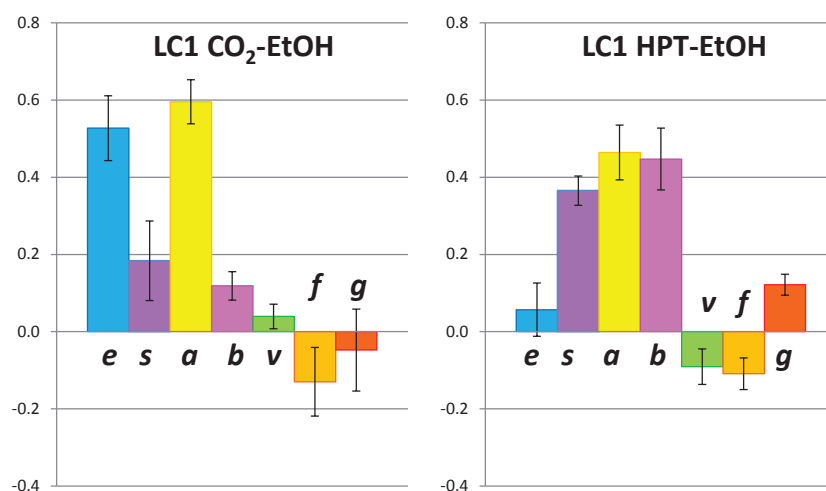


Figure 3.3 : Modèles LSER (coefficients normalisés) des systèmes chromatographiques obtenus sur Lux Cellulose-1 avec l'éthanol en chromatographie en phase supercritique (SFC) et à polarité en phase normale (NPLC). Conditions détaillées en annexe 4.

La rétention diffère à travers :

- Une contribution plus importante des interactions π - π (terme e) en SFC, contrebalancée par une contribution plus importante des interactions dipôle-dipôle (terme s) en NPLC. Mais encore une fois ces deux termes sont quelque peu corrélés.
- Une contribution différente des liaisons hydrogènes (termes a et b) avec des interactions plus importantes avec les composés acides en SFC et plus importantes avec les composés basiques en NPLC.

En SFC, la plus faible intensité du terme b peut s'expliquer par la nature du CO_2 . Bien qu'il soit généralement décrit comme une molécule apolaire, le CO_2 est en fait bien plus réactif et interactif que l'heptane employé en NPLC. En effet, à travers la présence de son site acide de Lewis (charge partielle positive sur le carbone), c'est une espèce réactive. La littérature décrit la réaction entre une amine primaire ou secondaire en présence de CO_2 conduisant à la formation d'acide carbamique [13]. Bargmann-Leyder et al. [14] décrivent également la complexation du CO_2 et du propranolol via les sites basiques de Lewis (charges partielles négatives sur les atomes d'oxygène). Le changement de conformation induit par cette complexation serait responsable d'une énantiosélectivité plus importante en SFC (2,07) qu'en NPLC (1,14). En parallèle, l'équipe de Francotte confirme l'impact du CO_2 sur la densité électronique du proton de la fonction amine de la molécule [15] dans le cadre de leur étude sur l'amino-alcool phenylalaninol. Cependant, il n'en résulte pas toujours un impact positif sur la résolution chirale [16].

- On observe enfin une contribution inversée de la taille (terme ν) et la forme (terme g) de l'analyte entre SFC et NPLC. La première observation (terme ν) peut être liée à deux facteurs différents : les interactions dispersives (ou interactions de London, existant entre un dipôle instantané et un dipôle induit) et l'énergie nécessaire à créer une cavité au sein d'un milieu cohésif. C'est ce dernier phénomène qui prédomine en RPLC et y explique les termes ν positifs qui y sont toujours observés, résultant des interactions hydrophobes. Les phases mobiles CO_2 -alcool sont, elles, beaucoup moins cohésives que les phases aqueuses. Dans ce cas, un terme ν positif est plus probablement le résultat d'interactions dispersives. La sélectivité méthylène est une autre manière de mesurer ces interactions puisqu'elle résulte d'une seule différence de

volume moléculaire, un groupement méthylène ne contribuant théoriquement à aucune autre propriété (polarité, polarisabilité ou capacité de former des liaisons H). Nous traçons alors la variation de $\log k$ pour une série d'alkylbenzènes homologues en fonction du nombre de carbones dans la chaîne alkyle (Figure 3.13). On observe que le mode NPLC présente une pente négative qui traduit un comportement cohérent avec le mode de rétention « phase normale » puisque l'augmentation du volume moléculaire (sans accroissement de polarité) cause une diminution de la rétention. Notons que l'alignement est imparfait en raison de la difficulté à mesurer des rétentions avec justesse pour des composés élués très près du temps mort. A l'inverse, le mode SFC présente une pente positive indiquant qu'un accroissement du volume moléculaire hydrophobe cause une augmentation de la rétention. Cette observation est en accord avec les comportements généralement observés en SFC sur les phases stationnaires achirales de type aromatique [17]. On peut donc conclure de cette observation que le mode chromatographique SFC sur ces PSC ne correspond pas au mode normal puisque l'accroissement de polarité (termes e , s , a et b) et l'accroissement de volume hydrocarboné (terme v) causent tous deux une augmentation de rétention.

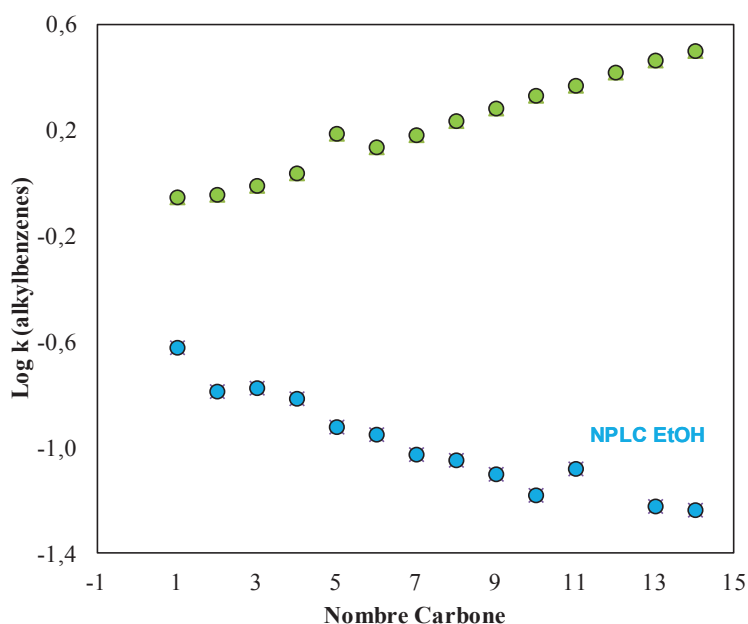


Figure 3.4 : Variation de la rétention ($\log k$) pour une série d'alkylbenzènes homologues en fonction du nombre de carbones dans la chaîne alkyle, en SFC (●) et en NPLC (●) avec l'éthanol comme co-solvant.

Le changement de signe du terme g (associé à la sphéricité de l'analyte) suggère enfin une modification de l'accès aux cavités de la phase stationnaire entre la phase mobile SFC et la phase mobile NPLC.

En conclusion de cette comparaison, on a observé des différences significatives des termes d'interaction polaires (e , s , a , b) comme des termes relatifs à la taille et la forme des analytes (v et g). Des sélectivités différentes sont donc attendues dans les deux modes. C'est pourquoi le transfert de méthode HPLC-SFC n'est pas aussi élémentaire. Ajoutons que la comparaison des modèles établis avec l'isopropanol comme co-solvant polaire conduisent à des conclusions identiques. De plus, ces résultats sont cohérents avec ceux observés sur les phases glycopeptides macrocycliques présentés au paragraphe précédent.

2.1.3. Force éluante

La figure 3.14 compare les logarithmes des facteurs de rétention de 192 composés achiraux sur Lux Cellulose-1 en SFC et en NPLC. L'ensemble des composés est situé au-dessus de la première bissectrice, indiquant que les composés sont plus retenus en SFC qu'en NPLC. A un débit identique et composition en phase mobile comparable (nature et proportion de modificateur), le fluide supercritique possède une force éluante plus faible que celle de l'éluant liquide.

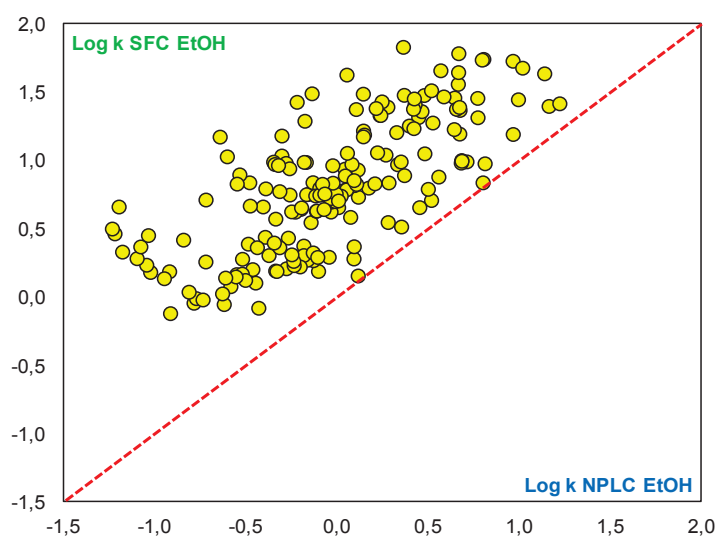


Figure 3.5 : Evaluation de la force éluante entre le mode SFC et NPLC

La rétention des énantiomères E1 et E2 de 6 formes racémiques dans les deux modes chromatographiques est représentée sur deux autres PSC polysaccharides, Chiralpak AD (figure 3.15) et Chiralpak IC (figure 3.16). Les énantiomères sont presque systématiquement moins retenus en NPLC.

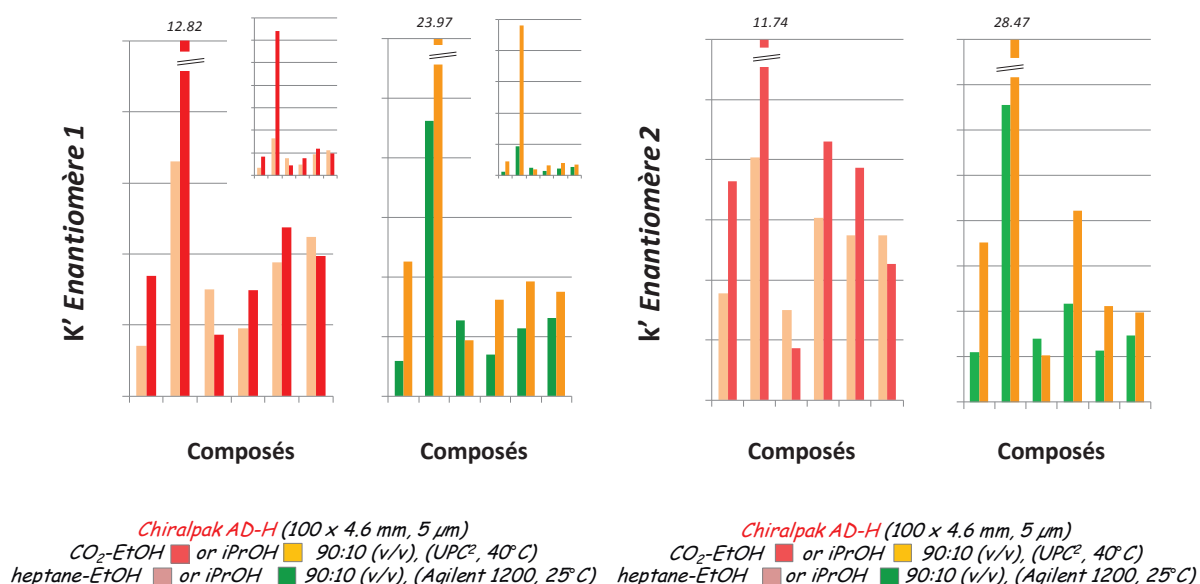


Figure 3.6 : Rétention des énantiomères 1 et 2 de 6 formes racémiques sur Chiralpak AD en SFC et en NPLC.
 *Collaboration avec l'équipe d'Eric Francotte (Novartis Global Discovery Chemistry, Bâle).

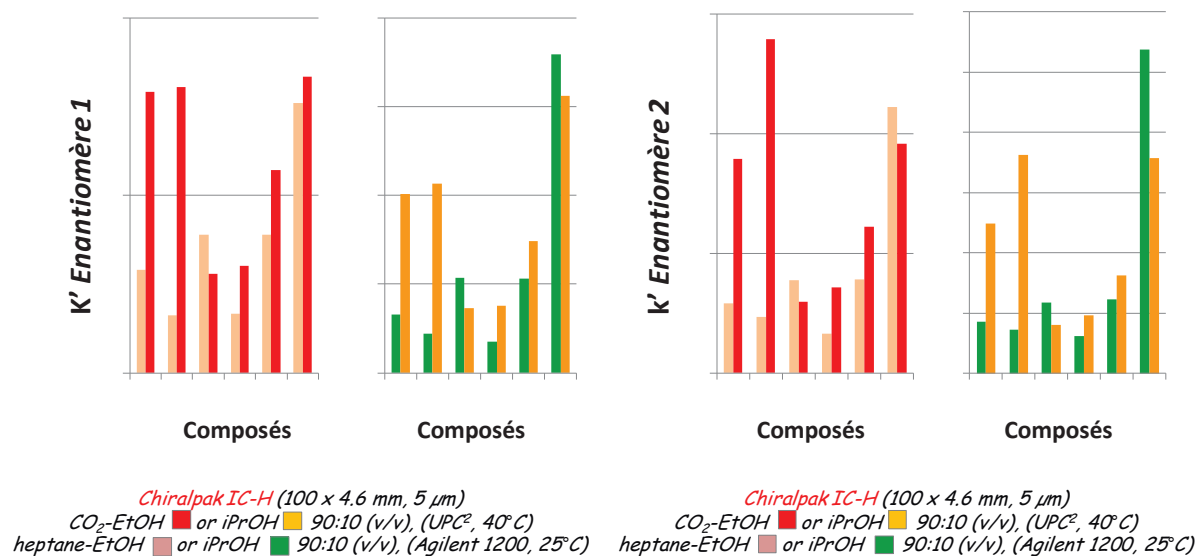


Figure 3.7 : Rétention des énantiomères 1 et 2 de 6 formes racémiques sur Chiralpak IC en SFC et en NPLC.
 *Collaboration avec l'équipe d'Eric Francotte (Novartis Global Discovery Chemistry, Bâle).

Par exemple, la séparation du binaphthol (Fig. 3.17) sur Chiralpak AD est nettement plus rapide en NPLC (heptane-2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min, 25°C) qu'en SFC à débit identique (CO₂-2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min, 40°C). Mais la faible viscosité des phases mobiles à base de dioxyde de carbone permet d'augmenter le débit plus facilement (sans perte substantielle d'efficacité) qu'avec les phases mobiles liquides. Augmenter le débit en SFC par un facteur 4 permet ainsi d'obtenir des temps d'analyses comparables entre les deux méthodes. En se plaçant dans des conditions d'utilisation optimales de la SFC, les temps d'analyse sont ainsi souvent plus courts. Dans le cas de l'exemple ci-dessous, la résolution est de plus bien meilleure en SFC, ce qui n'est pas nécessairement le cas.

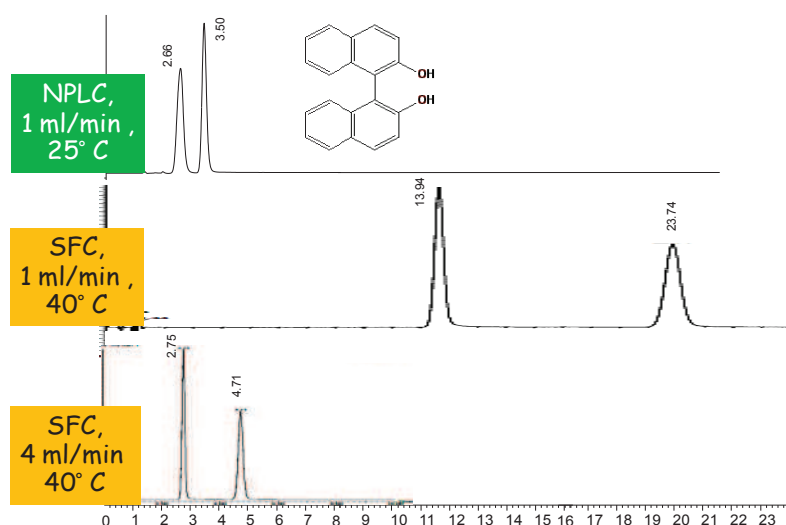


Figure 3.8 : Analyse du binaphthol en NPLC (heptane-2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min, 25°C), en SFC (CO₂-2PrOH (90:10,v/v), 1 ml/min et 4 ml/min, 40°C). *Collaboration avec l'équipe d'Eric Francotte (Novartis Global Discovery Chemistry, Bâle).

2.2. Propriétés de séparation

En effet, la force éluante est sans relation avec la séparation énantiomérique. La figure 3.18 représente la comparaison des facteurs de séparation en SFC et en NPLC en fonction de la nature du modificateur.

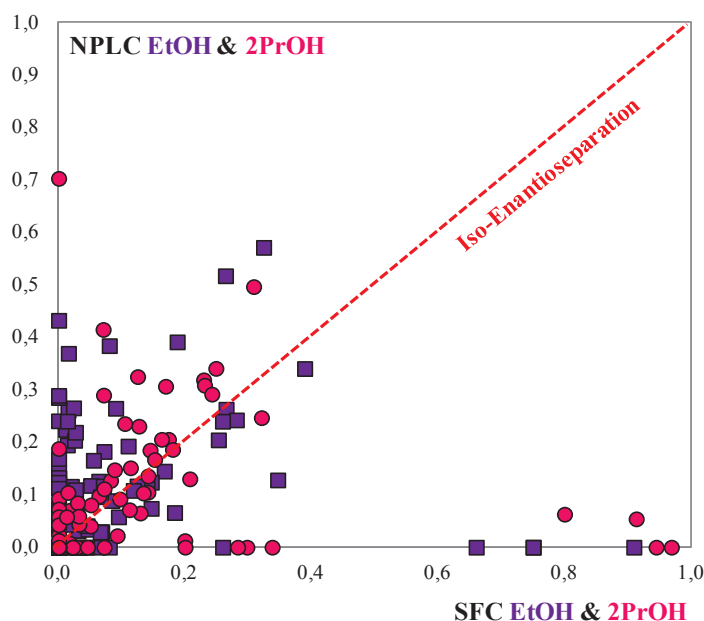


Figure 3.9 : Comparaison des facteurs de séparation ($\log \alpha$) en SFC et en NPLC, en utilisant l'éthanol (EtOH) ou l'isopropanol (2PrOH) comme modificateur.

On observe d'abord que de nombreux points se trouvent relativement proches de la première bissectrice, indiquant que la séparation de ces composés est comparable entre les deux modes. Néanmoins, de nombreux points apparaissent proches des axes, voire même sur les axes, indiquant une séparation totale dans un mode et faible voire nulle dans l'autre mode. Avec l'éthanol, les taux de succès sont plus importants en NPLC alors qu'avec de l'isopropanol de meilleures performances sont atteintes en SFC. On peut imaginer plusieurs causes à ces différences, notamment, comme il a été évoqué plus haut, une participation active du CO_2 interagissant avec les analytes ou une modification de l'accès aux cavités énantiosélectives en fonction du milieu.

Une analyse discriminante 4 classes a été réalisée afin d'identifier les caractéristiques structurales communes à la :

- Classe 1 comprenant les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élués avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Classe 2 comprenant les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élués après la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Classe 3 comprenant les racémiques non séparés ($\alpha = 1$) et élués avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Classe 4 comprenant les racémiques non séparés ($\alpha = 1$) et élués après la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)

La figure 3.19 présente le comportement rétentif des racémiques, séparés ou non, en fonction de la prédiction de rétention, sur Lux Cellulose-1 et en utilisant l'éthanol comme modificateur.

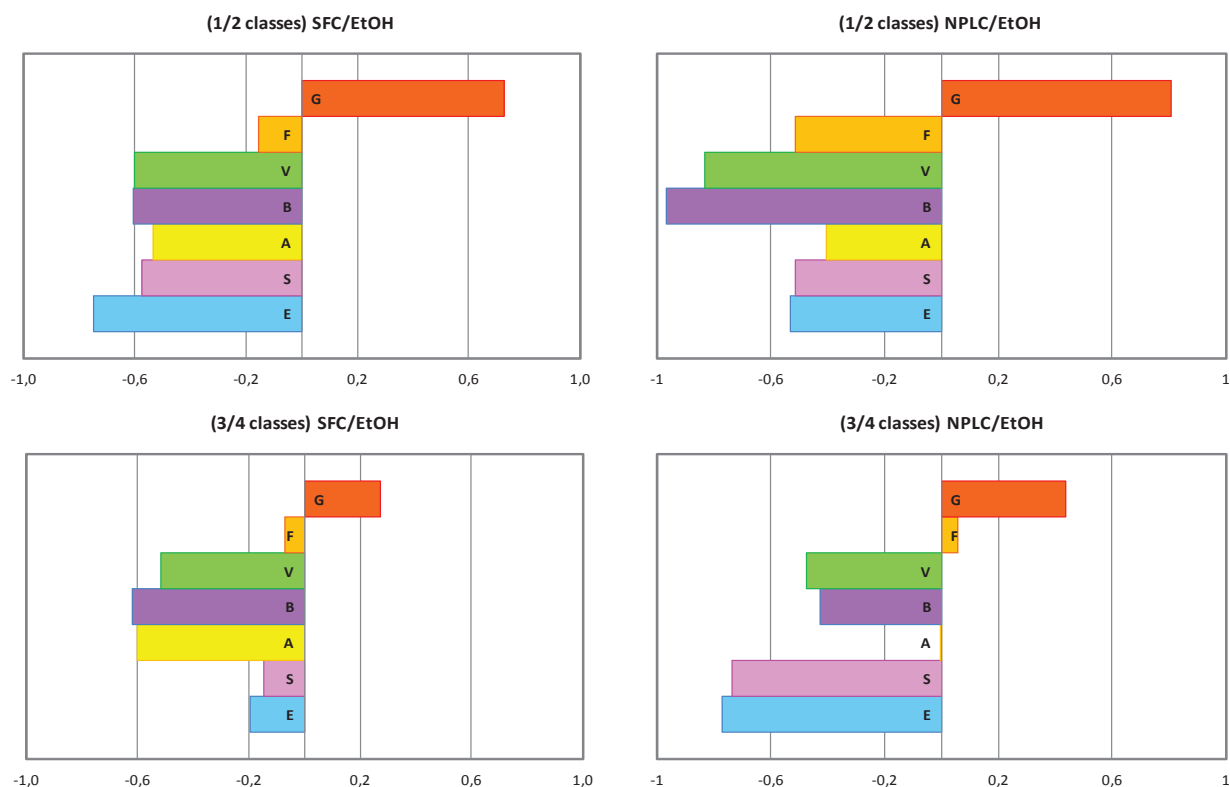


Figure 3.10 : Modèles discriminant les racémiques « élués avant » et « après » la prédiction de rétention sur Lux Cellulose-1 dans les deux modes chromatographiques. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques élués avant la prédiction de rétention (classe 1 et classe 3). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques élués après la prédiction de rétention (classe 2 et classe 4).

Quelle que soit la valeur du facteur de séparation α , les racémiques les plus retenus sont des molécules sphériques (le terme G pointe vers la droite) et petites (car le terme V pointe vers la gauche). A l'inverse, les molécules les moins retenues sont de larges molécules allongées ou plates. Pour ces molécules, l'accessibilité à certaines cavités chirales peut être limitée. La rétention est alors gouvernée par des interactions attractives mettant en jeu les termes E, S, A et B.

Les résultats obtenus avec l'éthanol sont transposables à l'isopropanol.

La figure 3.20 compare les caractéristiques structurales communes aux racémiques séparés et co-élus, sur Lux Cellulose-1 et en utilisant l'éthanol comme modificateur.

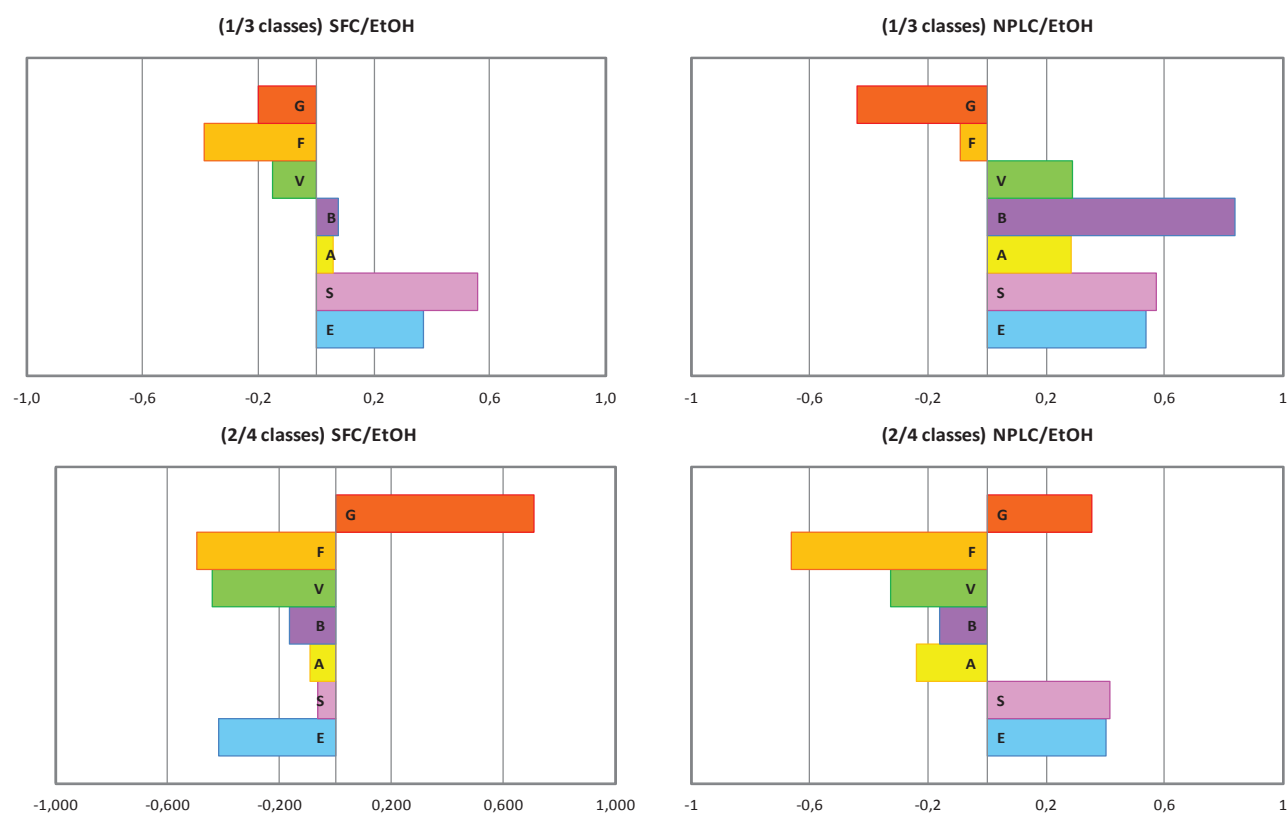


Figure 3.11 : Modèles discriminant les racémiques séparés et co-élus sur Lux Cellulose-1 dans les deux modes chromatographiques. Les variables sont définies par les descripteurs moléculaires du modèle des paramètres de solvation. Les caractéristiques négatives sont communes aux racémiques co-élus (classe 3 et classe 4). Les caractéristiques positives sont communes aux racémiques séparés (classe 1 et classe 2).

Pour tous les racémiques, qu'ils soient plus (classes 2/4) ou moins retenus (classes 1/3), la discrimination des énantiomères est différente en SFC et en NPLC.

Pour les moins retenus (classes 1/3), en présence d'une phase mobile heptane-éthanol, le caractère donneur et accepteur de liaisons hydrogènes (termes A et B) de la molécule est nettement favorable à une séparation. En SFC, ces propriétés apparaissent comme peu significatives. En SFC les interactions π - π et dipôle-dipôle avec les groupements phényles du sélecteur chiral sont privilégiés.

Dans le cas des racémiques les plus retenus (classes 2/4), la différence entre les deux modes chromatographiques repose sur le caractère aromatique et dipolaire de la molécule. Ces

propriétés sont favorables pour expliquer la discrimination en NPLC alors qu'elles sont défavorables ou non significatives en SFC.

3. Conclusion

La transposition d'une méthode développée en NPLC vers la SFC n'est pas toujours linéaire et il est évident que le mécanisme de reconnaissance chirale dépend du mode chromatographique employé.

Il semblerait que la structure tridimensionnelle soit différente en présence d'une phase mobile comprenant du CO₂ ou de l'heptane, ce qui induirait l'existence de cavités chirales singulières à chacun des deux modes. De plus, la réactivité et les capacités d'interaction du CO₂ impactent fortement les capacités énantiosélectives du système chromatographique.

IV. Influence des additifs sur les séparations chirales en SFC

1. Introduction

Lors du développement et de l'optimisation d'une méthode chirale, l'ajout d'un additif est souvent envisagé afin d'*améliorer la forme des pics chromatographiques*. Il peut également, en deuxième intention, *favoriser la détection en spectrométrie de masse, modifier la rétention et la sélectivité* [18,19,20]. Plusieurs hypothèses ont été formulées sur l'influence de l'additif sur la séparation chirale :

- Le choix d'un additif dépend des groupements fonctionnels et de la charge de la molécule analysée : un additif acide (acide trifluoroacétique, acide acétique, acide formique) est employé pour l'analyse de composés acides et un additif basique (diéthylamine, triéthylamine, isopropylamine) pour l'analyse de bases. Il en résulte généralement une diminution de la rétention, due à une compétition entre l'additif et la molécule pour les sites d'adsorption de la PSC.
- Des considérations stériques peuvent être associées à l'efficacité de l'additif. La triéthylamine est une amine tertiaire encombrée. Bien qu'elle soit plus simple à éliminer du système chromatographique, elle est moins efficace que les amines primaires, telle que l'isopropylamine [21]. L'hydroxyde ammonium, additif basique, est utilisé pour améliorer la résolution chirale des composés basiques. Il se positionne comme une alternative intéressante à l'utilisation des amines, notamment à l'échelle préparative car sa bonne volatilité n'est pas une gêne lors de l'évaporation des fractions [21].

Dans d'autres cas, la nature de l'additif et de l'analyte ne sont plus en accord. Stringham *et al.* rapportent l'emploi de l'acide éthylsulfonique (acide fort) pour améliorer la résolution chirale d'un composé basique en SFC. Les auteurs assimilent la variation de sélectivité chirale à la formation d'une paire d'ions entre l'additif et le composé basique [22].

- L'emploi simultané de deux additifs, de nature opposée, a également été imaginé. Il peut en résulter des taux de succès plus élevés [23,24].

La discussion ci-dessous constitue les prémisses de l'étude de l'influence des additifs sur les séparations chirales en SFC, mais relève des résultats encourageants. Ces travaux se déclinent en deux volets :

- La présence simultanée d'une base et d'un acide (l'isopropylamine et l'acide trifluoroacétique) pour l'analyse du jeu de composés (achiral et racémique) sur Chiralpak IB, dérivé immobilisé tris-(diméthylphenylcarbamate) de cellulose.
- L'influence de l'ajout de base ou d'acide (la diéthylamine ou de l'acide formique) sur le comportement rétentif et énantiosélectif de Chirobiotic T, dérivé glycopeptide macrocyclique.

2. Résultats

Chiralpak IB est un dérivé immobilisé diméthylphenylcarbamate de cellulose. Nous avons étudié l'influence de la présence simultanée de l'isopropylamine et l'acide trifluoroacétique (0,1%) sur le comportement de cette phase. Le choix de ces additifs repose sur l'étude de De Klerck *et al.* [23]. Les auteurs ont évalué le potentiel d'outils chimiométriques pour quantifier le degré de similarité entre des systèmes chromatographiques en SFC sur une cinquantaine de racémiques, dont 80% de composés basiques. Utilisés simultanément, les additifs induisent dans ce cas une amélioration du taux de succès. Par ailleurs, d'autres observations nous ont indiqué que cette PSC est sensible à la présence des additifs, plus, par exemple, que son homologue non immobilisée Chiralcel OD.

La figure 3.21 compare la rétention des composés achiraux avec et sans additifs. Les espèces neutres sont peu perturbées par la présence des additifs puisqu'elles sont situées sur la première bissectrice. A l'inverse, les espèces acides et basiques sont majoritairement plus retenues dans des conditions sans additifs. La diminution de rétention en présence des deux additifs suggère qu'il existe un mécanisme de compétition entre les additifs et la molécule d'intérêt pour les sites d'adsorption de la PSC, ou des mécanismes d'appariement d'ions entre analytes acides et additif basique, et vice-versa.

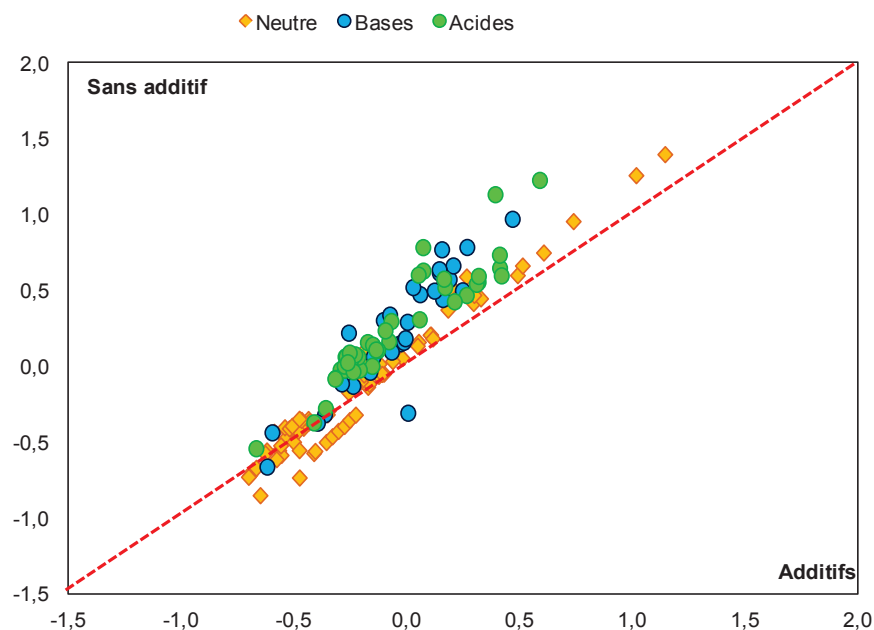


Figure 3.12 : Comparaison de la rétention des composés achiraux sur Chiralpak IB en présence ou non d'additifs.

Ces commentaires sont en accord avec l'interprétation des modèles LSER en présence ou non d'additifs, présentés Figure 3.22. En présence des additifs, le terme a est moins intense alors que le terme b devient négligeable. Les liaisons hydrogène entre les composés acides/basiques et la phase stationnaire, que ce soit avec le carbamate du sélecteur chiral ou le support de silice, sont minimisées.

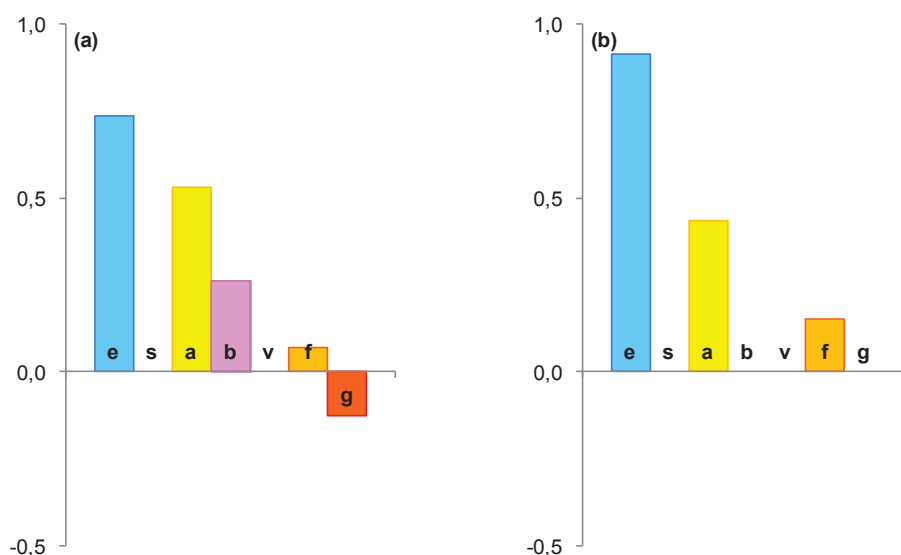


Figure 3.13 : Les coefficients bêta (e , s , a , b , v , f et g) issus d'une régression linéaire multiple sur Chiralpak IB (a) sans et (b) en présence de l'isopropylamine et l'acide trifluoroacétique. Chaque bar représente la contribution d'une interaction à la rétention.

La figure 3.23 représente la comparaison des facteurs de séparation observés pour notre set de composés chiraux analysés avec et sans additif. La figure est répétée une seconde fois (Fig. 3.24) en zoomant sur les facteurs de séparation les plus faibles, où s'agglomèrent une large majorité des composés.

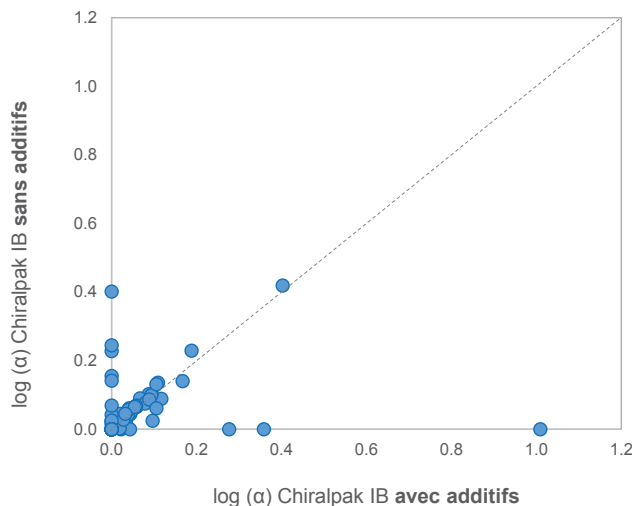


Figure 3.14 : Comparaison des facteurs de séparation des racémiques obtenus dans des conditions avec et sans additifs sur Chiralpak IB.

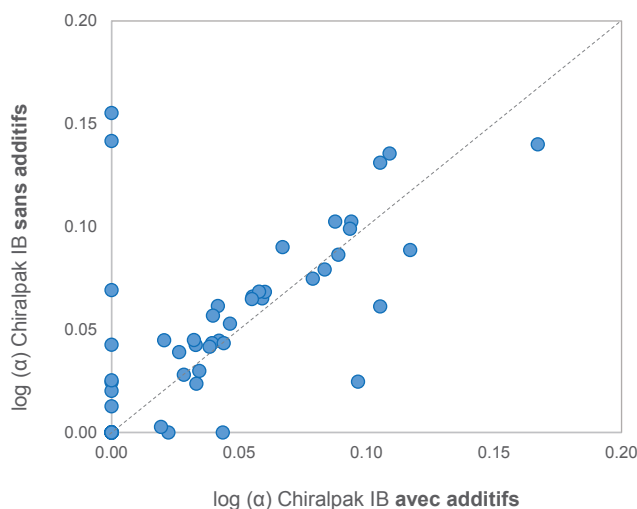


Figure 3.15 : Zoom de la Fig. 3.24 afin de mettre en évidence les plus faibles valeurs des facteurs de séparation

On peut observer que de nombreux points se trouvent à proximité de la première bissectrice, ce qui semble indiquer que, pour ces composés, le mécanisme de séparation est peu affecté par la présence d'un additif. En revanche, de meilleures formes de pics ont pu être observées, résultant donc probablement d'une meilleure solubilité dans la phase mobile et non d'interactions fortes avec la PSC. Quelques composés diffèrent significativement entre les

deux conditions. Pour ces derniers, on peut raisonnablement supposer que le mécanisme de séparation diffère. Ajoutons que des taux de succès pratiquement équivalents (Figure 3.25), de l'ordre de 50%, et des facteurs de séparation moyens quasiment identiques sont observés entre les deux conditions. Chiralpak IB employé avec additifs présente une spécificité de 6% avec des valeurs de facteurs de séparation plus importantes pour des composés acides (fenoprofen, suprofen, dichlorprop ou mecoprop methyl ester).

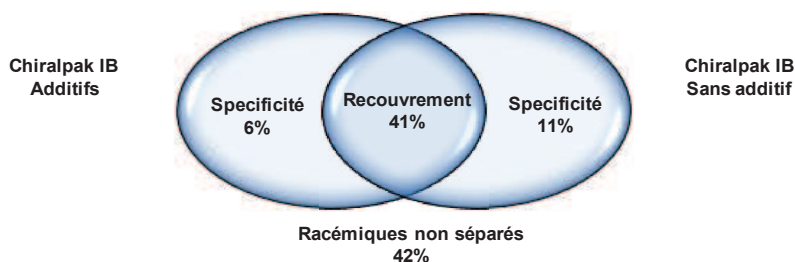


Figure 3.16 : Diagrammes de Venn représentant les performances globales de Chiralpak IB en présence (simultanée d'isopropylamine et d'acide trifluoroacétique) ou non d'additifs

Dans le cas de cette colonne, donc, l'avantage du mélange d'additifs proposés par De Klerck *et al.* semble essentiellement résider en l'amélioration de la forme des pics. De ce fait, la résolution s'en trouve améliorée sans que l'énantiosélectivité soit nécessairement modifiée.

Zhang *et al.* ont observé une influence positive de l'ajout d'un additif acide pour l'analyse de composés basiques sur Chiralpak IB [24]. Les auteurs supposent la formation d'une paire d'ion entre l'additif anionique et la molécule basique protonée. Cette paire d'ions a peut-être des interactions différentes que l'analyte seul avec la PSC. On peut aussi envisager un recouvrement dynamique de l'additif anionique à la surface de la phase stationnaire, donc des interactions différentes entre l'analyte et la PSC modifiée.

Dans des travaux précédents [25], nous avons montré que Chiralpak IB présentait une proportion plus faible de polysaccharide que son homologue non immobilisée Chiralcel OD, qui suggérait une plus grande disponibilité du support de silice pour établir des interactions non-spécifiques. L'additif basique pourrait alors être utile pour minimiser les interactions non-spécifiques avec les silanols résiduels. Une autre hypothèse est que la silice supportant le polysaccharide n'ait pas subi les mêmes modifications. En effet, pour Chiralcel OD, la silice est vraisemblablement modifiée par un greffage aminopropyle avant le dépôt du

polysaccharide. Il est possible que la procédure d'immobilisation, notamment si elle implique un greffage covalent sur le support, mette en jeu d'autres modifications de surface. En quelque sorte, l'additif basique serait « déjà présent » dans Chiralcel OD (greffons aminopropyle) mais devrait être ajouté dans la phase mobile pour Chiralpak IB.

Dans le cas de la phase Chirobiotic T, l'ajout d'acide formique dans la phase mobile n'a pas de réel impact sur la rétention des composés achiraux puisque l'ensemble du jeu de composé est situé sur la première bissectrice. En SFC, le caractère « acide » du dioxyde de carbone [1] peut se substituer à l'ajout d'un additif acide dans la phase mobile, sauf pour les composés ayant des pKa acides particulièrement bas comme les fonctions sulfoniques. Ce commentaire est en accord avec la grande similarité entre les modèles LSER obtenus avec ou sans additif acide (figure 3.26 (a) et (b)).

En revanche, l'ajout de diéthylamine induit une légère diminution du temps de rétention des composés basiques. Le modèle LSER, Figure 3.26 (c), indique une contribution plus faible du terme b , ce qui suggère que les interactions achirales avec les composés basiques sont minimisées en présence de diéthylamine. De plus, les contraintes stériques semblent s'atténuer puisque le terme g passe de significativement négatif à nul, indiquant que les composés sphériques qui étaient peu retenus sans additif seraient mieux retenus avec. Le terme v a également augmenté (il est moins négatif) indiquant également que les composés volumineux sont maintenant plus retenus.

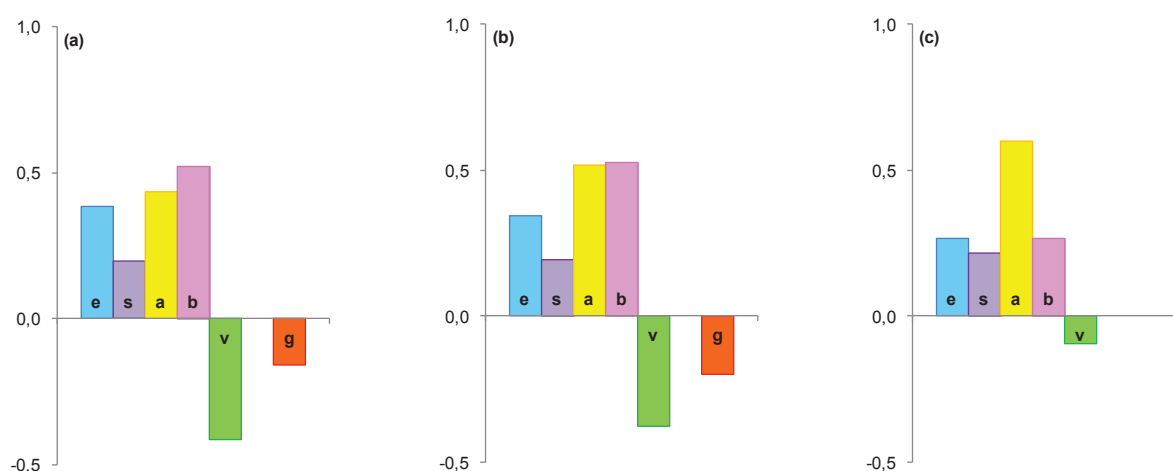


Figure 3.17 : Constantes du système obtenues sur Chirobiotic T (a) sans, (b) en présence d'acide formique et (c) en présence de diéthylamine

Dans les différents cas, l'ajout d'un additif a un impact mineur sur les performances énantiosélectives. La figure 3.27 représente des diagrammes de Venn pour comparer les taux de succès, spécificité et complémentarité de différentes conditions opératoires.

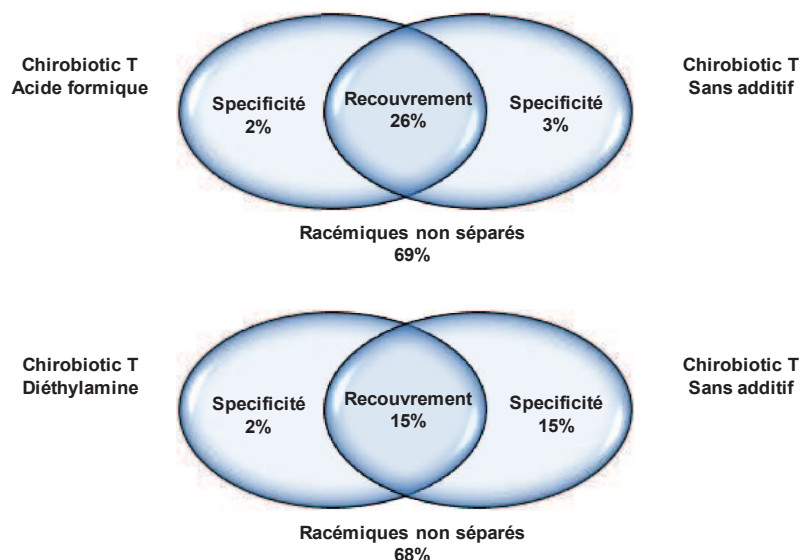


Figure 3.18 : Diagrammes de Venn représentant les performances globales de Chirobiotic T en présence ou non d'additifs (acide formique ou diéthylamine)

La phase Chirobiotic T présente des performances globales comparables en présence d'acide (en accord avec l'observation ci-dessus que les interactions non spécifiques ne semblent pas affectées par l'additif acide) mais des performances nettement plus faibles en présence de base. Cependant, il est important de souligner que ces phases présentent un réel intérêt dans des applications de niche (travaux non publiés). Quelle que soit la nature de l'additif, les spécificités (racémiques séparés en présence d'additif mais non séparés sans additif) sont assez faibles. Ici non plus, donc, l'avantage d'un additif dans la phase mobile ne semble pas évident en termes d'énantiosélectivité, même si, encore une fois, l'énantiorésolution peut se trouver améliorée par une meilleure solubilisation des analytes.

3. Conclusion

Cette étude présente les prémisses de l'étude de l'influence de l'additif sur le mécanisme de reconnaissance chirale en SFC. Le modèle modifié des paramètres de solvation a été employé (eq. 2.3) pour caractériser les similarités/dissimilarités des capacités rétentives et énantiosélectives de Chiralpak IB et Chirobiotic T.

La première limitation de ce travail concerne la non-description des interactions électrostatiques qui caractérisent, entre autre, les phases glycopeptides macrocycliques.

L'addition de descripteurs ioniques se présente alors comme une perspective nécessaire. Ce travail nécessitera une estimation du pH et du pKa des différentes entités dans des conditions supercritiques, ainsi qu'une réévaluation des 7 premiers descripteurs.

Références du chapitre III

- [1] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, J. Chromatogr. A 1041 (2004) 211.
- [2] Y. Zhang, D.-R. Wu, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, Drug Discovery Today 10 (2005) 571.
- [3] B. Chankvetadze, J. Chromatogr. A 1269 (2012) 26.
- [4] G. Török, L. Goetelen, R. Luyckx, P.V. Broeck, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 425.
- [5] A.A. Younes, H. Ates, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, J. Pharm. Biomed. Anal. 75 (2013) 74.
- [6] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, J. Chromatogr. A 1269 (2012) 336.
- [7] Z. Wang, M. Jonca, T. Lambros, S. Ferguson, R. Goodnow, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 720.
- [8] V. Scott Sharp, Nicole Hicks, J. Stafford, LC-GC North America 31 (2013) 622.
- [9] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, A. Berthod, J.Chromatogr. A 1166 (2007) 70.
- [10] A. Berthod, C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, J.Chromatogr. A 1166 (2007) 61.
- [11] E.C. Vonk, K. Lewandowska, H.A. Claessens, R. Kaliszan, C.A. Cramers, J. Sep. Sci. 26 (2003) 777.
- [12] W. Kiridena, C. F. Poole, Analyst 123 (1998) 1265.
- [13] Z.J. Dijkstra, A.R. Doornbos, H. Weyten, J.M. Ernsting, C.J. Elsevier, J.T.F. Keurentjes, The J. Sup. Fluids 41 (2007) 109.
- [14] N. Bargmann-Leyder, C. Sella, D. Bauer, A. Tambute, M. Caude, Anal. Chem. 67 (1995) 952.
- [15] K. Anton, J. Eppinger, L. Frederiksen, E. Francotte, T.A. Berger, W.H. Wilson, J.Chromatogr. A 666 (1994) 395.
- [16] C.R. Lee, J.P. Porziemsky, M.C. Aubert, A.M. Krstulovic, J.Chromatogr. A 539 (1991) 55.
- [17] C. West, E. Lesellier, J.Chromatogr. A 1115 (2006) 233.
- [18] J.A. Blackwell, Chirality 10 (1998) 338.
- [19] J.A. Blackwell, Chirality 11 (1999) 91.
- [20] Y. Zhao, G. Woo, S. Thomas, D. Semin, P. Sandra, J.Chromatogr. A 1003 (2003) 157.

- [21] W. Ren-Qi, O. Teng-Teng, N. Siu-Choon, T. Weihua, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012) 83.
- [22] R.W. Stringham, *J.Chromatogr. A* 1070 (2005) 163.
- [23] K. De Klerck, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, *J.Chromatogr. A* 1326 (2014) 110.
- [24] T. Zhang, P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi, T. Murakami, *J.Chromatogr. A* 1269 (2012) 178.
- [25] S. Khater, Y. Zhang, C. West, *J.Chromatogr. A* 1303 (2013) 83.

Chapitre IV

La chémoinformatique pour cartographier les phases chirales

I. Préambule

Dans les années 1980, une première classification de PSC a été proposée, en fonction de la nature du sélecteur chiral. Cependant, cette classification est basée sur une connaissance *a priori* de la nature de la phase stationnaire, qui ne préjuge en rien des similitudes ou différences d'énantiorésolution. Quelques années plus tard, Wainer s'interroge: « How to choose the right column? » [1] et identifie cinq catégories (Table 4.1) pour classer une trentaine de PSC disponibles. Cette classification repose sur la manière dont est formé le complexe diastéréomérique, ainsi que sur les différences stéréochimiques induites par la formation de ce complexe.

Type	Mécanisme
I	Discrimination basée sur les interactions attractives (liaisons hydrogène, interactions π - π)
II	Discrimination basée sur le concept d'inclusion, associé à des interactions attractives
III	Discrimination basée sur le concept d'inclusion
IV	Discrimination basée sur la formation d'un complexe diastéréomérique entre un métal et un ligand (échange de ligand)
V	Discrimination basée sur les interactions hydrophobes et polaires (protéine)

Tableau 4.1 : Classification de phases stationnaires chirales proposée par Wainer [1,2].

Aujourd'hui, la littérature recense et décrit plus de 1700 phases stationnaires chirales (http://chirbase.u-3mrs.fr/ChirBase_overview.html). Assigner une PSC à une catégorie peut s'avérer être une tâche difficile, d'autant plus que les PSC développées aujourd'hui sont parfois multimodales (peuvent être employées en phase normale, inverse, polaire organique, supercritique...).

Or, nous avons montré au chapitre précédent que le mode chromatographique affecte le mécanisme de reconnaissance chirale. Les phases Pirkle sont un exemple de l'évolution continue des phases stationnaires chirales. Aujourd'hui, elles reposent sur des sélecteurs chiraux plus complexes [3] permettant alors de couvrir un large spectre d'applications associé à des bonnes performances chromatographiques [4]. Les PSC de type cyclofructanes sont un

autre exemple de la difficulté rencontrée pour classer les PSC. En effet, si les dérivés d'alkyles [5] employés en mode polaire organique appartiennent à la classe III, les dérivés arylés, [6] permettant la résolution d'un panel de molécules chirales plus important en phase normale, appartiennent à la classe II [3].

Récemment, Lough s'est interrogé sur la validité actuelle de la classification de Wainer au regard de la diversité actuelle des PSC [3]. Si dans les années 1980, les polysaccharides étaient à peine créés, les phases à échange d'ions et les glycopeptides inexistants, en 2014, au moins 13 groupes pourraient être formés pour classer les PSC disponibles en fonction de la nature du sélecteur chiral.

A partir des modèles mathématiques développés au chapitre précédent, des cartographies rétentives et énantiosélectives des PSC en SFC sont proposées afin de guider le chromatographe dans sa démarche de développement de méthode chirale. La discussion qui suit illustre l'application des outils d'analyses multivariées (annexe 2), en parallèle, afin de faire ressortir les informations avec une certaine objectivité scientifique.

II. Cartographie rétentive

Le tableau 4.2 présente les coefficients du système obtenus après régression linéaire multiple de 30 phases stationnaires chirales de type Polysaccharide, Pirkle et Glycopeptides Macrocycliques. Ces données sont dans un premier temps mises en perspective. Elles reflètent les interactions soluté/PSC et soluté/éluant.

Le code couleur et la numérotation des colonnes du tableau 4.2 servent de repères pour l'ensemble des cartographies.

	Colonnes	e	s	a	b	v	f	g
1	Chiralpak AD	-0,731	0,000	0,718	0,338	0,000	0,000	-0,164
2	Chiralpak IA	-0,558	0,136	0,691	0,289	0,000	0,000	-0,092
3	RegisPack	-0,694	0,000	0,761	0,543	0,000	0,000	-0,038
4	AmyCoat	-0,634	0,000	0,780	0,567	0,088	0,000	-0,083
5	Reposil Chiral-AM	-0,776	0,000	0,845	0,553	-0,281	0,000	-0,323
6	Chiralpak AS	-0,573	0,000	0,689	0,510	0,000	0,000	-0,096
7	Chiralcel OD	-0,694	0,000	0,535	0,175	0,000	0,000	-0,181
8	Lux Cellulose-1	-0,695	0,000	0,637	0,278	0,000	0,052	-0,040
9	RegisCell	-0,705	0,000	0,817	0,269	0,000	0,036	-0,049
10	CelluCoat	-0,760	-0,163	0,515	0,330	0,000	0,000	-0,083
11	Reposil Chiral-OM	-0,751	0,000	0,624	0,188	0,000	0,000	-0,205
12	Chiralpak IB	-0,639	0,000	0,748	0,425	0,000	0,019	-0,090
13	Reposil Chiral-CM	-0,845	0,000	0,801	0,945	-0,577	0,000	-0,536
14	Chiralcel OJ	-1,131	-0,260	0,480	-0,274	-0,097	0,000	-0,158
15	Lux Cellulose-3	-1,078	-0,270	0,660	-0,143	-0,133	0,000	-0,217
16	Reposil Chiral-JM	-1,121	-0,309	0,534	-0,245	0,000	0,000	-0,082
17	Lux Cellulose-2	-0,505	0,242	0,482	0,552	0,000	0,000	-0,128
18	Lux Cellulose-4	-0,543	0,253	0,407	0,737	-0,438	0,000	-0,297
19	Lux Amylose-2	-0,525	0,000	0,502	0,737	0,299	0,000	-0,165
20	RegisPack CLA-1	-0,492	0,134	0,434	0,519	0,305	0,000	-0,116
21	Sepapak 5	-0,730	0,000	0,500	1,463	-0,278	0,000	-0,301
22	Chiralpak IC	-0,577	0,000	0,323	0,853	-0,254	0,000	-0,258
23	Chiralpak ID	-0,421	0,266	0,495	0,679	0,000	0,000	0,000
24	Chiralpak IE	-0,464	0,273	0,322	0,944	-0,131	0,000	-0,267
25	WhelkO-1	-0,508	0,000	0,749	0,749	0,263	-0,048	-0,176
26	Reposil Chiral-NR	0,438	0,000	0,254	0,573	0,177	-0,028	-0,114
27	P-CAP	-0,496	0,000	1,616	0,235	0,000	0,027	0,000
28	Chirobiotic T	-0,547	0,346	1,012	1,218	-0,759	0,000	-0,357
29	Chirobiotic TAG	-0,656	0,271	1,118	1,086	-0,776	0,000	-0,458
30	Chirobiotic V2	-0,639	0,000	1,445	0,859	-0,435	0,000	-0,418

Tableau 4.2 : Coefficients, obtenus par régression linéaire multiple, caractérisant les interactions contribuant à la rétention sur chacune des PSC étudiées.

Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale est une méthode d'analyse de données non supervisée qui permet d'étudier les corrélations entre variables et projeter les observations dans un espace de dimension réduite, tout en conservant un maximum d'information (Annexe 2).

La figure 4.1 représente la projection des colonnes dans un espace à deux dimensions, pour lequel 65% de la variabilité initiale est expliquée. Les deux axes correspondent aux deux premières composantes principales (CP), combinaisons linéaires des variables initiales.

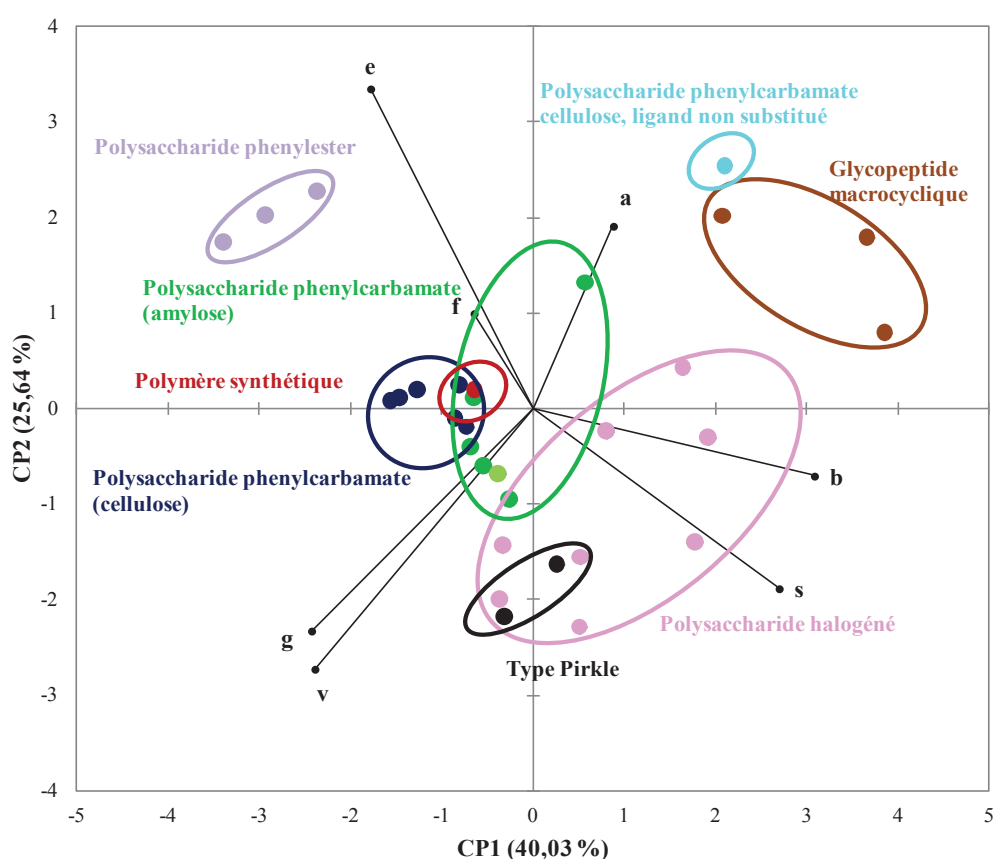


Figure 4.1 : Le score plot représente la projection des PSC en fonction des constantes du système

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Variabilité (%)	40,0	25,6	18,2	9,3	3,8
Variabilité cumulée (%)	40,0	65,6	83,8	93,5	97,3

Tableau 4.3 : Variabilité expliquée par les composantes principales

La première composante principale est fortement corrélée au caractère acide des PS (coefficient b) et permet de discriminer les Glycopeptides Macrocycliques des supports de type polysaccharide. Ce résultat n'est pas surprenant puisque ces trois glycopeptides sont vraisemblablement les plus différents de toutes les autres phases de ce set, c'est donc normal qu'elles soient distinguées par CP1.

Dans cet espace à deux dimensions, les phases phenylesters de polysaccharide constituent un ensemble plutôt singulier en termes de rétention. Cette singularité est à relier aux coefficients e (l'aromaticité) et a (la basicité de la phase) corrélés à la CP2, mais aussi au terme b négatif, défini comme l'absence de caractère donneur de proton de la PSC. Parmi les polysaccharides, ce sont les seules phases contenant une fonction ester, alors que toutes les autres ont une fonction carbamate.

Le dérivé cellulosique Reprosil Chiral-CM a également une position distincte puisque l'absence de substituants sur le groupement aromatique modifie l'intensité des liaisons hydrogène et des interactions π - π .

La variance expliquée par les deux premières CP ne permet pas d'identifier les dissimilarités entre les polysaccharides non halogénés de type phenylcarbamate. Les zones des dérivés amylose (vert) et cellulose (bleu) non chlorés se chevauchent.

Les phases halogénées constituent une classe plutôt hétérogène et une source de comportement rétentif différent. Leur répartition est plutôt éclatée. C'est une classe intrinsèquement diverse avec des amyloses, des celluloses, des mono- et di-halogénés. Le MultiDimensional Scaling (MSD) permet d'obtenir une représentation dans un espace à trois dimensions de cette zone (Fig. 4.2).

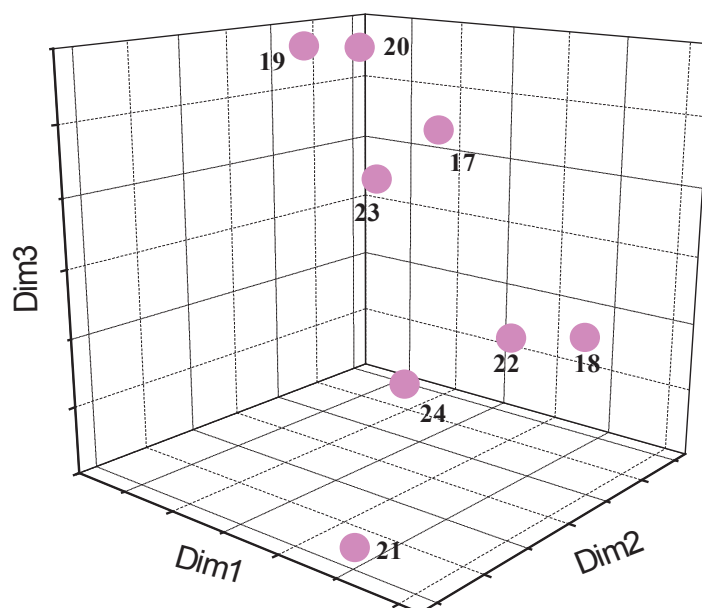


Figure 4.2 : Zoom sur la zone des phases halogénées et projection des PSC dans un espace à trois dimensions par MultiDimensional Scaling

Cependant, si on comprend la similarité entre les supports 19 et 20 (PSC « copies »), il est difficile d'expliquer la similarité dans les supports 17/23 (Chiralpak ID, dérivé amylose monohalogéné immobilisé ; Lux Cellulose-2, dérivé cellulose dihalogéné adsorbé), 24/22/18 (Chiralpak IE, dérivé amylose dihalogéné immobilisé ; Chiralpak IC, dérivé cellulose dihalogéné immobilisé ; Lux Cellulose-4, dérivé cellulose dihalogéné adsorbé) et la singularité du 21 (Sepapak-5, dérivé cellulose dihalogéné adsorbé).

Le tableau 4.3 (ci-dessus) présente la variabilité expliquée par les CP, par ordre décroissant. Il faudrait au moins 5 CP pour expliquer au mieux, plus de 90% de la variabilité. Le polymère synthétique P-CAP et les phases de type Pirkle sont noyés dans les phases de type polysaccharide sur la figure 4.1. Ils se distinguent dans un espace défini par CP1 et CP3, pour lequel 58% de l'information est expliqué. Alors que la position de P-CAP est très corrélée au termes f (flexibilité) et a (interactions avec des composés donneur d'hydrogène), les phases Pirkle (Whelk-O1 et Reprosil-NR) sont anti-corrélées à ces coefficients.

Diagramme en étoile

La figure 4.3 est une autre représentation de la classification avec diverses chimies de phase stationnaire. Le diagramme en étoile est une projection des phases stationnaires dans un espace de sélectivité à sept dimensions, définies par les constantes du système.

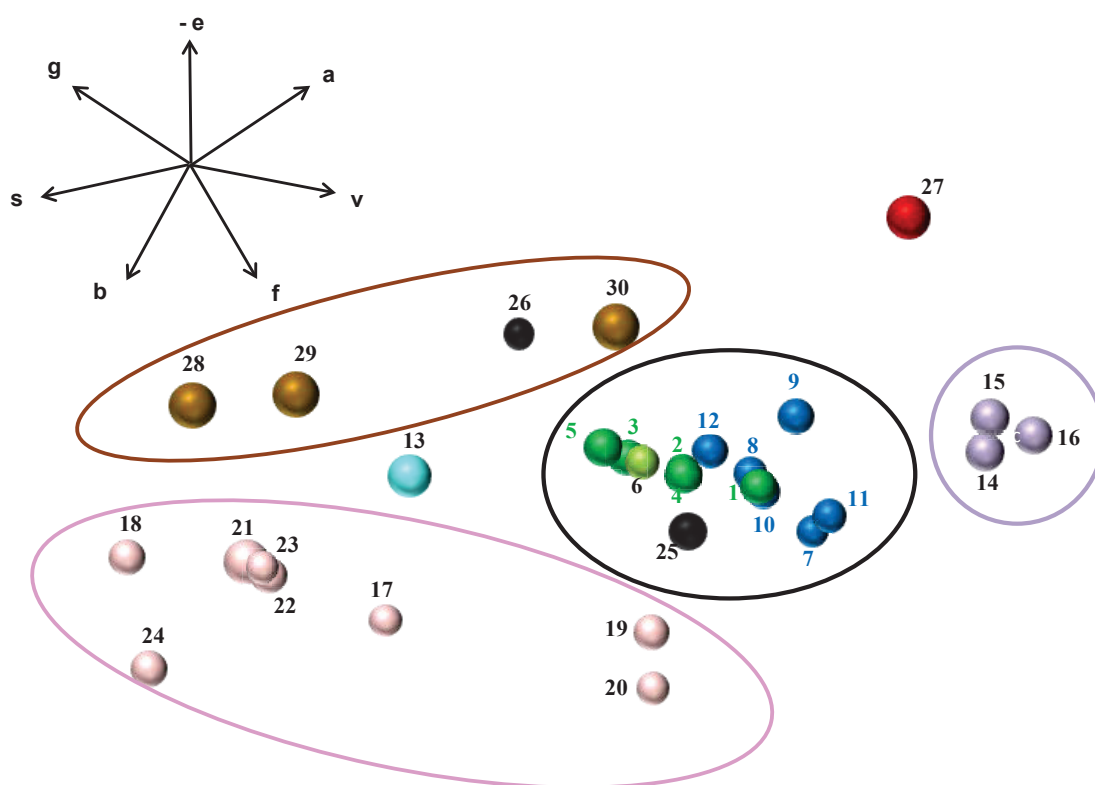


Figure 4.3 : Cartographie rétentive des phases stationnaires chirales en SFC

Chaque phase stationnaire chirale est positionnée en fonction des valeurs normalisées des constantes du système. En effet, afin de comparer la contribution relative des interactions, chaque constante du système est divisée par le vecteur de solvation u (ou norme), défini par l'équation (4.1):

$$u_i = \sqrt{e_i^2 + s_i^2 + a_i^2 + b_i^2 + v_i^2 + f_i^2 + g_i^2} \quad (4.1)$$

Chaque colonne est représentée par une bulle. Sa taille est associée à la somme totale des interactions (terme u_i ci-dessus) alors que sa position est liée au type et à la force relative des interactions développées. Les Glycopeptides Macrocycliques (n°28 à 30), le support à base de polymère synthétique (n°27 ; P-CAP) et un dérivé polysaccharide halogéné (n°21 ;

Sepapak-5) sont des supports très rétentifs, ce qui se reflète dans des bulles plus volumineuses.

Deux colonnes proches l'une de l'autre indiquent des interactions similaires, donc des ordres d'élution globalement identiques (éventuellement avec une rétention différente lorsque les interactions sont plus fortes sur l'une des deux colonnes). Il est important de souligner qu'il n'est ici question que d'ordre d'élution de composés n'ayant pas de relation d'énantiométrie, mais de composés ayant des propriétés structurales différentes donc capables d'interactions non spécifiques différentes. Les dérivés phenylcarbamates, qui diffèrent par la nature du polymère ou du ligand (n°1 à 12) développent des interactions non spécifiques proches.

A l'inverse, deux colonnes éloignées indiquent des interactions différentes. Dans le groupe des phases halogénées (n°18 à 24), si RegisPack CLA-1 (n°20) a un profil rétentif similaire à son homologue Lux Amylose-2 (n°19), il est différent de celui des phases immobilisées halogénées (n°23, 24).

Classification Ascendante Hiérarchique

Une classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été réalisée sur les logarithmes normalisés des facteurs de rétention ($\log k$) de 160 composés achiraux (Figure 4.4). La normalisation permet de s'affranchir de différences de rapport de phase si une colonne est plus densément « packée » qu'une autre. C'est une méthode de classification non supervisée dont le but est de former des clusters homogènes de PSC qui développent des interactions non spécifiques similaires. Elle compare donc des sélectivités non énantiospécifiques.

La ligne en pointillé rouge constitue la troncature et permet de visualiser 4 groupes. Cette troncature est celle proposée par le logiciel XLStat.

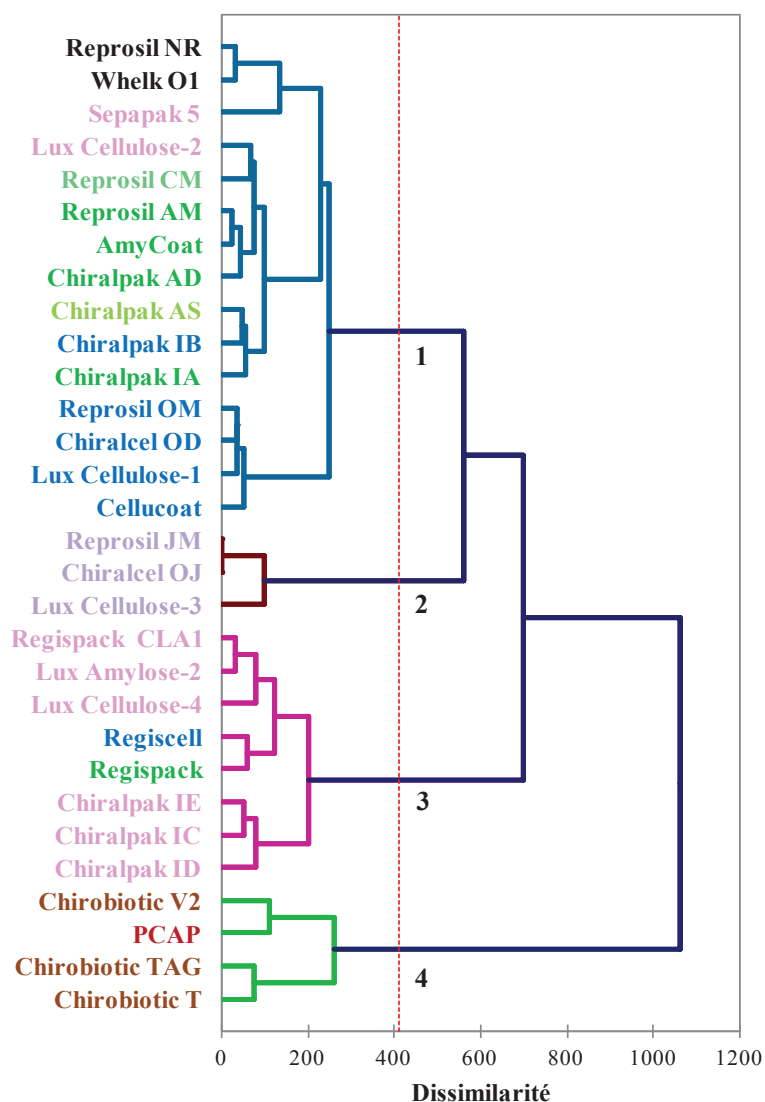


Figure 4.4 : Agglomération des PSC selon leur rétention en SFC

Les phases de type glycopeptides macrocycliques (*Groupe 4*) et phenylester (*Groupe 2*) sont regroupées, respectivement, dans des classes bien définies. Si au premier abord, les deux autres groupes sont plutôt hétérogènes, des familles se distinguent assez bien (les type-OD et -AD) avec quelques exceptions : les phases Pirkle sont identifiées dans le *groupe 1* ; Les positions de Lux Cellulose-2 et Sepapak-5 sont très surprenantes. Il en est de même pour les supports RegisCell et RegisPack dans le *groupe 3* ;

Dans le diagramme en étoile (Figure 4.3), le support à base de polymère synthétique, P-CAP, présente une position singulière. La CAH indique un profil de rétention sensiblement similaire à celui des supports macrocycliques. Or, il a été démontré que le mode

chromatographique employé affectait le comportement des phases macrocycliques. La rétention de ces phases pourrait alors s'apparenter à celui des polymères synthétiques en SFC.

La spécificité du processus d'immobilisation envers les capacités de la PSC à interagir avec le soluté est mise en avant dans les *groupes 1* et *3*. Chiralpak IA et IB se distinguent nettement de leurs homologues adsorbées. C'est également le cas avec les phases halogénées adsorbées vs. immobilisées.

III. Cartographie séparative

Les données de séparation ($\log \alpha$) de 97 racémiques sont mises en perspective afin de proposer une cartographie représentative des capacités énantiosélectives de 29 PSC en chromatographie en phase supercritique.

Analyse en composante principale

La projection des colonnes dans un espace à deux dimensions indique que seulement 25% de la variabilité initiale est expliquée. Dix-huit composantes principales sont nécessaires pour décrire au moins 90% de l'information. Le grand nombre de composantes nécessaire peut indiquer que la diversité du comportement énantiosélectif est importante parmi ces chimies de phases stationnaires chirales. Même si on peut penser que l'ACP n'est pas la méthode de choix pour représenter la sélectivité chirale, elle confirme d'une part la grande diversité de sélectivité chirale au sein du jeu de colonnes et d'autre part que le set de composés utilisés est approprié pour mettre en évidence cette diversité.

Classification Ascendante Hiérarchique

Une classification ascendante hiérarchique (Figure 4.5) a été réalisée sur les logarithmes normalisés de facteurs de séparation ($\log \alpha$) de 97 couples d'énantiomères. La méthode d'agrégation utilisée pour calculer la dissimilarité entre les groupes est celle de Ward. Or, nous savons que le type de lien affecte la manière dont on regroupe les observations. Parmi les modes d'agrégation proposés, seule la méthode de Ward propose un diagramme de nœuds avec une agrégation de structures homogènes des données et une objectivité scientifique.

Au premier abord, les niveaux de dissimilarité semblent plus importants que sur la CAH figure 4.4. Parmi la famille des phases polysaccharides, les capacités énantiosélectives sont très diverses et c'est pourquoi elles sont universellement utilisées. La diversité devient d'autant plus importante avec l'addition d'autres chimies de phases chirales.

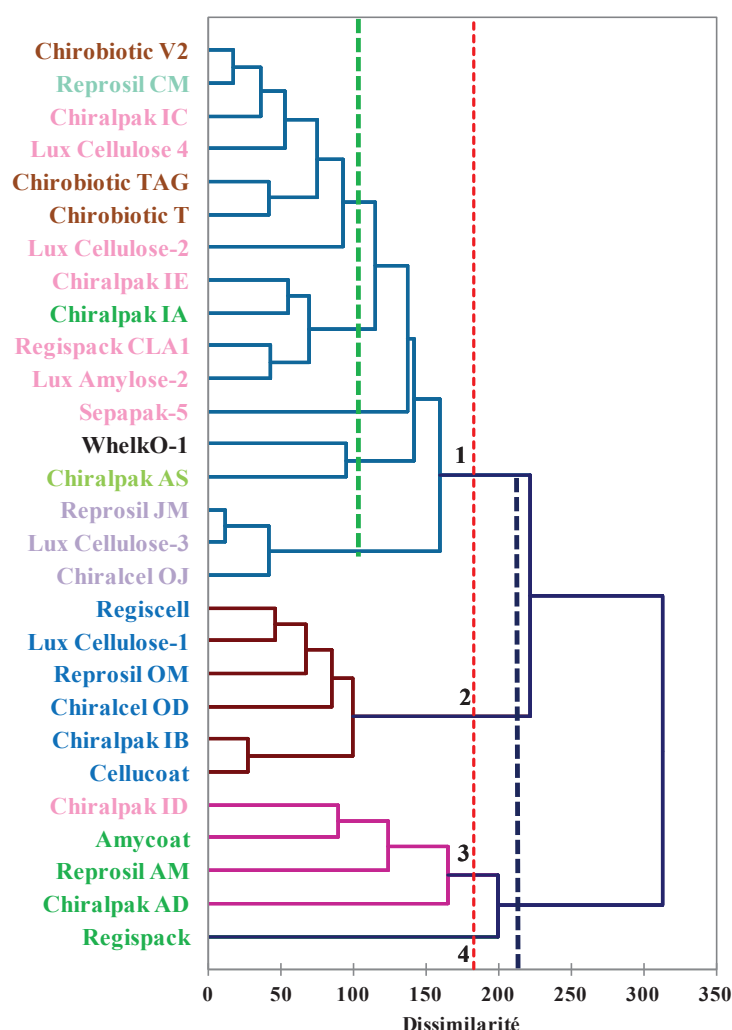


Figure 4.5 : Agglomération des PSC selon leurs capacités énantiosélective en SFC

La troncature pointillée rouge, proposée par le logiciel XLStat, identifie quatre groupes. Le *groupe 2* est composé majoritairement de polysaccharides de type cellulose *tris*-(3,5-diméthylphénylcarbamate. Les phases « génériques » de Chiralcel OD constituent des alternatives en termes de sélectivité, spécificité et taux de succès.

Le *groupe 3* est composé majoritairement de *tris*-(3,5-diméthylphénylcarbamate) d'amylose. Les facteurs contribuant à la séparation d'énantiomères ne sont pas parfaitement identiques entre les phases génériques et le support de Daicel (Chiralpak AD) [7]. Les niveaux de dissimilarité sont d'ailleurs plus importants que dans le *groupe 2*. La phase RegisPack de Regis Technologies présente des capacités énantiosélectives singulières. Cette singularité

pourrait être liée à sa position particulière dans la figure 4.4, à savoir la particularité de ses interactions non-énantiospécifiques.

Le *groupe 1* est assez hétérogène mais de grandes tendances se dessinent. Les capacités énantiosélectives des phases phénylester de cellulose sont similaires. Ce cluster regroupe également toutes les phases halogénées sauf une, Chiralpak ID. Le support Teicoplanin et sa forme aglycone sont également très similaires en SFC.

L'utilisateur pourrait définir des troncatures avec des niveaux de similarité différents. Dans le bas de la figure, le trait en pointillé bleu met en évidence deux groupes plus ou moins homogènes avec les type-OD et AD qui se distinguent largement. Au contraire, dans la partie haute de la figure, on pourrait envisager le trait en pointillé vert qui permettrait de fragmenter le *groupe 1*. Lors d'un criblage de colonnes, on retrouve généralement Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralcel OJ, Chiralpak AS, une phase de type Brush (Whelk-O1), une ou deux phases halogénées, des phases glycopeptides macrocycliques et polymère synthétique [8,9].

Diagramme en étoile

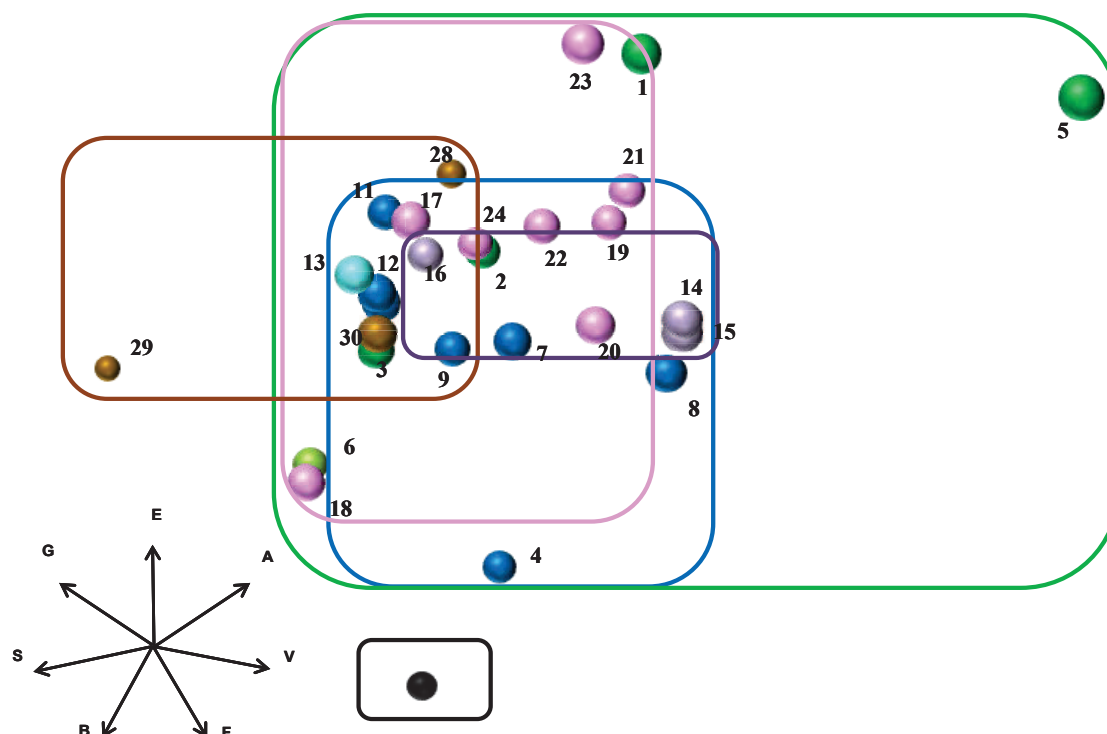


Figure 4.6 : Cartographie énantiosélective des phases stationnaires chirales en SFC

La figure 4.6 correspond à la projection des phases stationnaires chirales dans un espace de sélectivité à sept dimensions, défini par les sept descripteurs moléculaires de l'équation (2.3).

Cette carte d'identité complète les commentaires de la classification ascendante hiérarchique obtenue figure 4.5. En effet, les phases de type tris-(diméthylphénylcarbamate) d'amylose (2) occupent un large espace du domaine de sélectivité. La phase Chiralpak AD est amplement utilisée pour son caractère universel.

De plus, il semble évident d'intégrer les phases glycopeptides macrocycliques (3) et les type Pirkle (4), en première intention, puisque leur espace de sélectivité est plutôt singulier.

Les domaines des phases halogénées (mono/di, amylose/cellulose) (5), ainsi que les types diméthylphénylcarbamate (6) et phénylester (7) de cellulose semblent s'emboîter comme les poupées russes. On atteint les limites de cette représentation. Il est difficile d'observer un problème multi-dimensionnel dans une projection bidimensionnelle.

IV. Conclusions

L'application du modèle modifié des paramètres de solvation associée à l'utilisation d'outils d'analyse de données a permis de construire des cartographies qui serviront au choix raisonné dans la sélection de PSC. L'analyse en composantes principales, le clustering et le diagramme en étoile caractérisent les similarités/dissimilarités du comportement chromatographique des phases. Il est important d'utiliser ces outils en parallèle et d'exploiter au maximum leur complémentarité afin de ne pas faire ressortir une information tronquée.

Les cartographies rétentives ont permis de mettre en avant la diversité de sélectivité chimique des phases chirales. Si deux phases ont des capacités énantiosélectives identiques, elles peuvent être distinguées en fonction de leurs profils d'impuretés achirales.

Les capacités énantiosélectives des PSC ont également été représentées. Compte tenu de l'hétérogénéité des phases et d'un mécanisme encore obscur, il est difficile de faire ressortir des clusters cohérents en fonction de nos connaissances. C'est pourquoi, il est important d'utiliser les cartographies en parallèle pour une meilleure sélection d'un jeu de colonnes

Références du chapitre IV

- [1] I.W. Wainer, TrAC, Trends Anal. Chem., 6 (1987) 125.
- [2] K.B. Lipkowitz, J. Chromatogr. A, 906 (2001) 417.
- [3] W.J. Lough, J. Chromatogr. B, 968 (2014) 1.
- [4] G.E. Job, A. Shvets, W.H. Pirkle, S. Kuwahara, M. Kosaka, Y. Kasai, H. Taji, K. Fujita, M. Watanabe, N. Harada, J. Chromatogr. A, 1055 (2004) 41.
- [5] P. Sun, C. Wang, Z.S. Breitbach, Y. Zhang, D.W. Armstrong, Anal. Chem., 81 (2009) 10215.
- [6] K. Kalíková, L. Janečková, D.W. Armstrong, E. Tesařová, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 1393.
- [7] S. Khater, Y. Zhang, C. West, J. Chromatogr. A, 1363 (2014) 278.
- [8] T.D. Nelson, C.J. Welch, J.D. Rosen, J.H. Smitrovich, M.A. Huffman, J.M. McNamara, D.J. Mathre, Chirality, 16 (2004) 609.
- [9] S. Mahdi Pourmortazavi, M. Rahimi-Nasrabadi, S. Somayyeh Hajimirsadeghic, Current Anal. Chem., 10 (2014) 3

Validation & Prédiction des modèles

I. Prédiction de la rétention d'après l'approche LSER

L'approche LSER peut être employée dans un but prédictif. La rétention d'un racémique sur un système donné peut être prédite selon la méthodologie décrite dans la figure 5.1 :

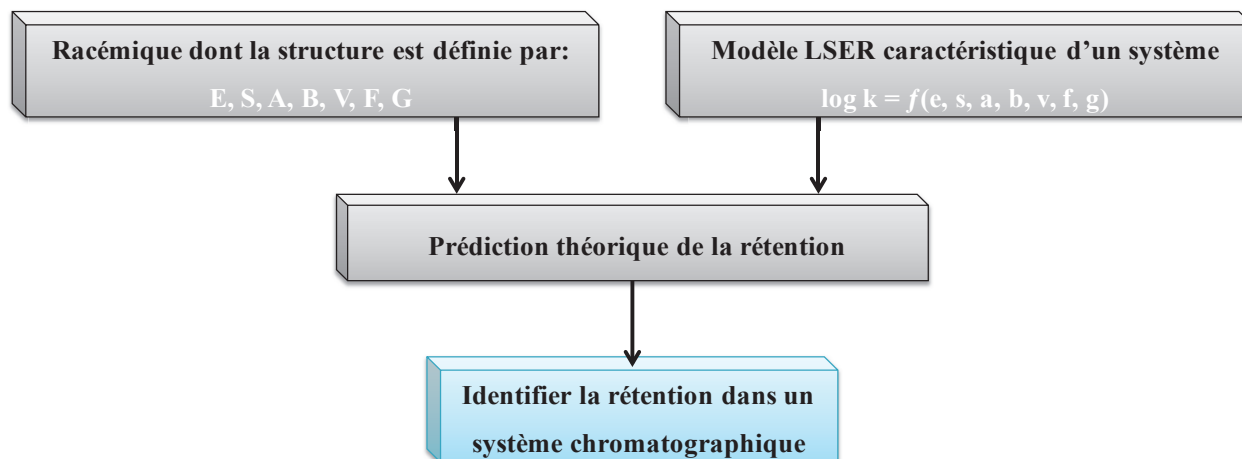


Figure 5.1 : Approche LSER appliquée dans un but prédictif

Les équations de type $\log k = f(e, s, a, b, v, f, g)$, identifiant les interactions non-spécifiques d'un système, ont été déterminées selon la procédure décrite au chapitre II. Etant donné que les énantiomères d'un racémique partagent le même jeu de descripteurs moléculaires, il est possible de déterminer UNE valeur de rétention dans un système donné.

Cette démarche peut se révéler utile pour l'identification des conditions pour **la mise au point d'une séparation préparative**. A grande échelle, des proportions relativement importantes de co-solvant sont préférables pour faciliter la solubilisation d'un échantillon. Or, un pourcentage élevé de co-solvant induit une diminution des temps de rétention. Dans ce cas, on cherchera à prédire des systèmes rétentifs.

A l'inverse, cette démarche peut être appliquée pour déterminer des conditions qui requièrent des temps d'analyse courts. C'est le cas pour la mesure **d'un excès énantiomérique** à haut débit.

Application n°1

L'exemple suivant illustre l'utilisation de cette méthodologie pour prédire la rétention de deux racémiques (métalaxyl et acétate de menthyle, Figure 5.2) sur le support Lux Cellulose-1 en employant divers modificateurs (méthanol, éthanol, 2-propanol). Les équations caractéristiques de chacun des systèmes sont représentées tableau 5.1.

Equations caractéristiques des systèmes Lux Cellulose/modificateur	
Méthanol	$\log k = -0,880 + (0,690 \times E) + (0,637 \times A) + (0,278 \times B) + (0,052 \times F) - (0,040 \times G)$
Ethanol	$\log k = -0,808 + (0,645 \times E) + (0,878 \times A) + (0,398 \times B) + (0,036 \times F) - (0,105 \times G)$
2-propanol	$\log k = -0,925 + (0,712 \times E) + (0,973 \times A) + (0,648 \times B) + (0,041 \times F) - (0,155 \times G)$

Tableau 5.1 : Equations LSER sur les systèmes Lux Cellulose-1/modificateur

Sur la figure 5.3, on peut observer la comparaison entre la prédiction et les observations expérimentales. Naturellement, comme les deux énantiomères ont les mêmes descripteurs, on ne peut prédire qu'une unique valeur de rétention. Pour le fongicide métalaxyl, on prévoit ainsi que la rétention augmente avec la longueur de chaîne de l'alcool employé comme co-solvant de la phase mobile. Expérimentalement, le métalaxyl est effectivement plus retenu en utilisant l'isopropanol comme modificateur.

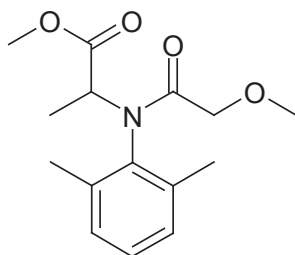


Figure 5.2 : Structure du métalaxyl

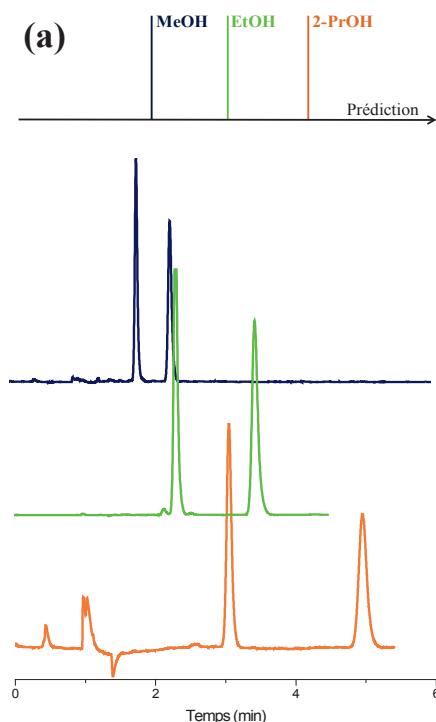


Figure 5.3 : Prédiction de la rétention sur les systèmes Lux Cellulose-1/modificateur du métalaxyl

Application n°2

Un autre exemple illustre la prédiction de la rétention d'un sédatif-hypnotique (le glutéthimide ; Figure 5.4) sur des PSC de type glycopeptide macrocyclique. Les équations caractéristiques de chacun des systèmes sont représentées table 5.2.

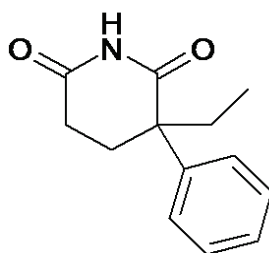


Figure 5.4 : Structure du Glutéthimide

Equations caractéristiques des systèmes dans un éluant CO ₂ /méthanol (90 :10)	
Chirobiotic T	$\log k = -0,880 + (0,690 \times E) + (0,637 \times A) + (0,278 \times B) + (0,052 \times F) - (0,040 \times G)$
Chirobiotic TAG	$\log k = -0,808 + (0,645 \times E) + (0,878 \times A) + (0,398 \times B) + (0,036 \times F) - (0,105 \times G)$
Chirobiotic V2	$\log k = -0,925 + (0,712 \times E) + (0,973 \times A) + (0,648 \times B) + (0,041 \times F) - (0,155 \times G)$

Tableau 5.2 : Equations LSER sur les systèmes glycopeptides macrocycliques employant comme phase mobile un mélange CO₂/MeOH

Comme précédemment, la position relative du glutethimide sur les différents supports énantiométriques est vérifiée expérimentalement. L'ordre d'élution relative du racémique est le suivant : Chirobiotic V2 < Chirobiotic T < Chirobiotic TAG.

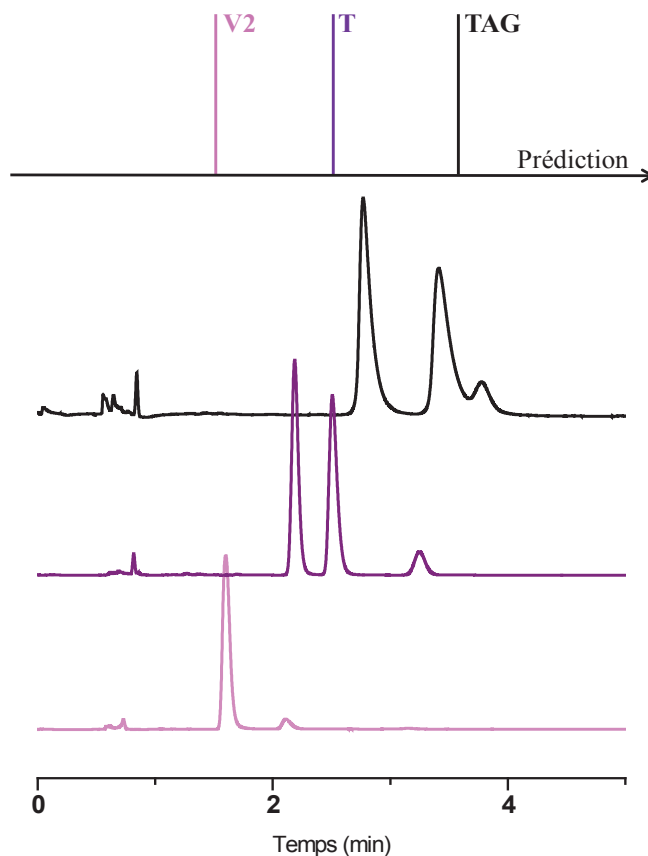


Figure 5.5 : Prédiction de la rétention sur les phases Glycopeptides Macrocycliques du Glutethimide.

Conclusion

Il est important de souligner que la prédiction rétentive ne présume en rien des capacités énantiométriques des supports chiraux. Il n'existe pas de corrélation entre la rétention et les capacités énantiométriques.

II. Prédiction de la séparation

Si les modèles développés permettent une interprétation cohérente du processus de reconnaissance chirale, qu'en est-il de leurs capacités prédictives ?

Les expériences de test présentées ici ont été réalisées lors d'un stage au sein de l'entreprise Bristol-Myers-Squibb, à Princeton (NJ, USA), dans l'équipe du Dr. Yingru Zhang.

Matériel et méthodes

Vingt-cinq racémiques, de concentrations de 3 mg/mL, ont été préparés en diluant une quantité précise et adéquate de chaque composé standard dans du méthanol. Les structures des molécules sont présentées Figure 5.6.

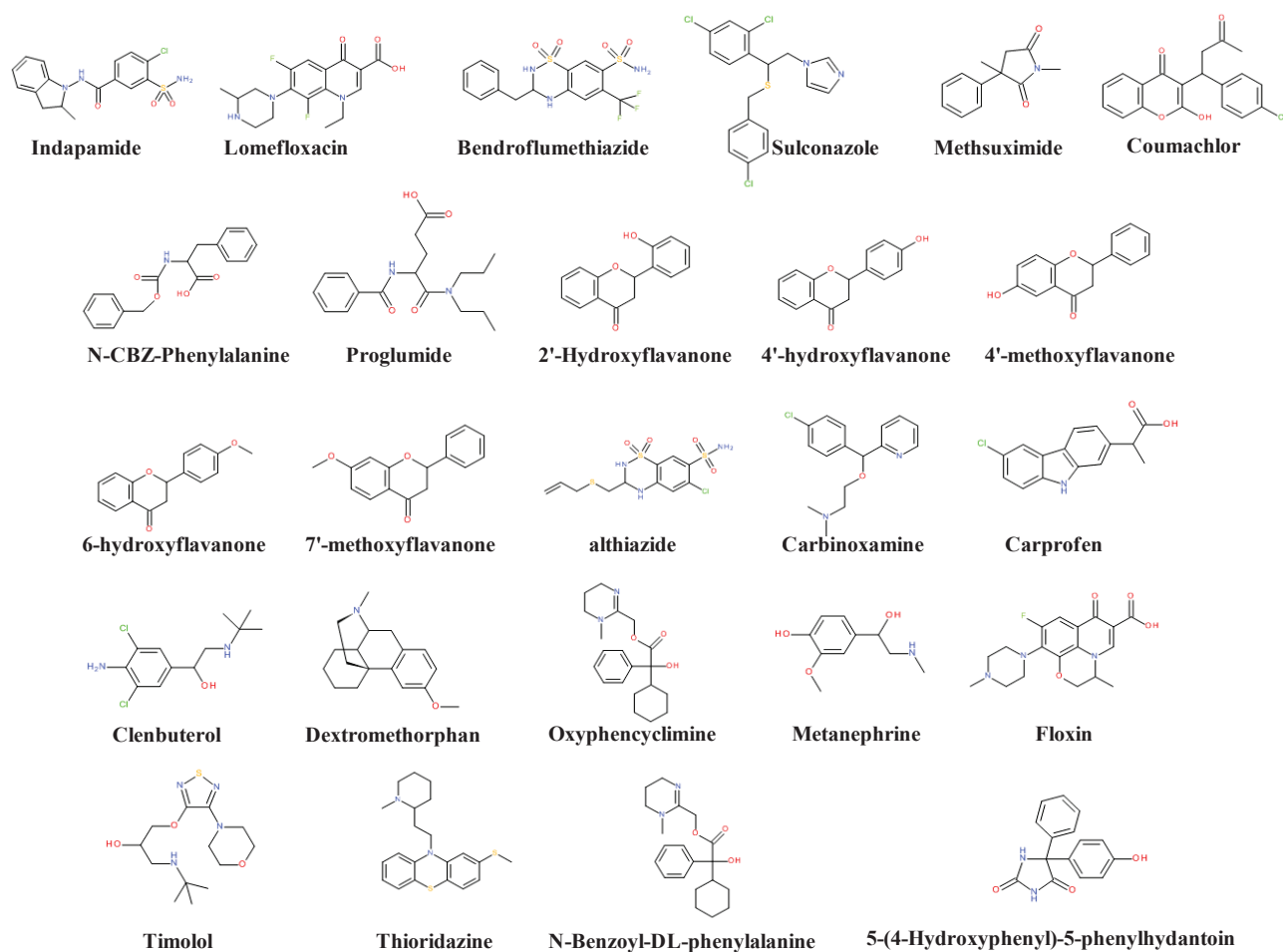


Figure 5.6 : Set de composés chiraux utilisés pour prédire la séparation à l'aide des AFD 2 classes.

Les descripteurs moléculaires (Table 5.3) ont été calculés avec ACD/Labs (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>), MOE 2009.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Canada), et QikProp 2009/08/20 (Schrodinger).

Composés	E	S	A	B	V	F	G
Indapamide	2,640	3,200	0,700	1,860	2,498	0,580	0,710
Bendroflumethiazide	2,280	2,890	1,010	1,840	2,552	0,520	0,957
Lomefloxacin	1,870	2,370	0,730	1,810	2,431	0,560	0,924
Sulconazole	2,550	2,260	0,000	0,760	2,705	1,150	0,710
Methsuximide	1,330	1,400	0,000	1,070	1,584	0,310	1,483
5-(4-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin	2,170	2,250	0,940	1,410	1,928	0,450	1,540
N-Benzoyl-DL-phenylalanine	1,640	2,410	0,830	1,130	2,078	1,190	1,177
N-CBZ-Phenylalanine	1,580	2,240	0,780	1,100	2,277	1,300	1,280
Proglumide	1,380	2,850	0,830	1,670	2,713	2,290	0,930
Coumachlor	2,130	2,360	0,310	1,220	2,430	0,770	0,944
2'-Hydroxyflavanone	1,880	1,970	0,500	1,000	1,771	0,250	1,279
4'-Hydroxyflavanone	1,880	1,970	0,500	1,000	1,771	0,250	1,174
6-Hydroxyflavanone	1,880	2,010	0,560	0,990	1,771	0,250	1,187
4'-Methoxyflavanone	1,710	1,860	0,000	0,940	1,912	0,480	1,154
7-methoxyflavanone	1,690	1,850	0,000	0,890	1,912	0,480	1,139
Althiazide	2,620	2,980	1,010	1,980	2,416	1,087	1,032
Carbinoxamine	1,560	1,640	0,000	1,230	2,269	1,429	0,765
Carprofen	2,290	1,880	0,880	0,740	1,935	0,476	1,154
Clenbuterol	1,500	1,440	0,610	1,380	2,065	0,883	1,014
Dextromethorphan	1,460	1,050	0,000	0,870	2,240	0,218	1,462
Floxin	2,260	2,580	0,570	2,050	2,504	0,345	0,918
Metanephrine	1,190	1,230	0,650	1,450	1,556	1,429	1,223
Oxyphencyclimine	1,520	1,210	0,170	1,560	2,762	0,926	1,011
Thioridazine	2,700	1,930	0,000	1,130	2,902	0,715	0,541
Timolol	1,470	1,850	0,170	1,790	2,376	1,364	1,316

Tableau 5.3 : Descripteurs moléculaires des racémiques du jeu de validation

La séparation des racémiques a été effectuée sur un système SFC Aurora (Agilent 1200) composé d'une pompe binaire Agilent 1200 G1312B et un passeur automatique G1329A. Il permet de travailler avec dix colonnes placées en parallèle deux à deux. Ce système est muni de détecteurs à barrettes de diodes G1315C et G1315B en série avec un détecteur dichroïsme circulaire Jasco CD-2195 Plus.

Les essais de prédiction ont été réalisés sur des phases, préalablement caractérisées selon la procédure définie dans le chapitre II, et disponible dans le laboratoire d'accueil : *Chiralpak AD*, *Chiralcel OD*, *Chiralcel OJ*, *Chiralpak AS*, *Chiralpak IE*, *Chiralpak ID*, *Chiralpak IA*, *Chiralpak IB* et *Chiralpak IC*, dont les dimensions étaient 250 x 4.6 mm ; 5 µm.

Validation externe

Une validation externe permet de contrôler la qualité prédictive du modèle développé sur le jeu d'estimation en déterminant la probabilité d'appartenance des observations d'un jeu de validation à une des catégories.

Le jeu de validation externe est celui représenté Figure 5.6. La discussion qui suit présente l'efficacité de cinq modèles. La matrice de confusion (Tableau 5.4) indique le pourcentage d'observations bien classées. Les vrais positifs (ou sensibilité) correspondent aux observations positives (énantiomères séparés) bien classées par le modèle. Les vrais négatifs (ou spécificité) correspondent aux observations négatives (énantiomères non séparés) bien classées par le modèle. Sur Chiralcel OD, 65% des prédictions sont correctes. Le modèle indique que 100% des racémiques séparés et 20% des racémiques coélus le sont vraiment. La prédiction sur Chiralpak IE et Chiralcel OJ est supérieure à 70% alors que sur Chiralpak IA et Chiralpak ID elle est égale à 57% et 65%, respectivement.

		Jeu d'estimation	Jeu de validation	AUC
Chiralcel OD	Vrai négatif	44% (34)	20% (10)	0,81
	Vrai positif	93% (88)	100% (13)	
Chiralpak IE	Vrai négatif	41% (44)	25% (4)	0,69
	Vrai positif	83% (63)	86% (14)	
Chiralpak IA	Vrai négatif	54% (52)	10% (10)	0,70
	Vrai positif	69% (59)	100% (11)	
Chiralcel OJ	Vrai négatif	67% (51)	20% (5)	0,77
	Vrai positif	71% (59)	100% (12)	
Chiralpak ID	Vrai négatif	38% (40)	20% (5)	0,70
	Vrai positif	83% (64)	80% (15)	

Tableau 5.4 : Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction « racémiques séparés - vrai positif » et « racémiques co-élus – vrai négatif »

La courbe ROC est l'évolution de la sensibilité en fonction de (1-spécificité). Ce critère indique l'efficacité du modèle en observant l'aire sous la courbe AUC (*Area Under Curve*). Par définition, AUC=1 correspond à un modèle idéal et AUC=0,5 à un modèle aléatoire. Les modèles sont jugés performants avec une aire sous la courbe supérieure à 0,7.

Sur l'ensemble d'estimation, il semble y avoir un rapport entre le nombre d'individus et la qualité de la prédiction. En effet, la prédiction est plutôt mauvaise pour les vrais négatifs. Pour Chiralpak IA et Chiralcel OJ, le pourcentage de vrais négatifs dans l'ensemble d'estimation augmente car le nombre d'observations est assez important. Cependant, ça ne se reflète pas dans l'ensemble de validation. Il semblerait que l'on soit face à des classes hétérogènes. Les raisons pour lesquelles $\alpha > 1$ ne sont pas les mêmes pour tous les racémiques séparés.

Nous avons donc tenté de déterminer les capacités prédictives des modèles 4 classes :

- Classe 1 comprend les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élus avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Class 2 comprend les racémiques séparés ($\alpha > 1$) et élus après la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Class 3 comprend les racémiques séparés ($\alpha = 1$) et élus avant la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)
- Class 4 comprend les racémiques séparés ($\alpha = 1$) et élus après la prédiction de rétention basée sur Eq. (2.3)

Le tableau 5.5 présente la matrice de confusion du jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction « racémiques élus avant la prédiction » (définis comme les vrais positifs) versus « racémiques élus après la prédiction » (définis comme les vrais négatifs). Les valeurs de l'aire sous la courbe AUC indiquent des modèles de prédiction correcte. La qualité d'estimation reste plutôt faible pour les vrais négatifs (racémiques élus après la prédiction) mais cela ne se reflète pas dans le jeu de validation. Sur Chiralcel OD, 90% des prédictions du jeu de validation sont correctes. Parmi les 21 racémiques élus avant la prédiction, 19 sont prédits avec succès.

		Jeu d'estimation	Jeu de validation	AUC
Chiralcel OD	Vrai négatif	44% (39)	50% (2)	0,80
	Vrai positif	88% (83)	90% (21)	
Chiralpak IE	Vrai négatif	32% (38)	75% (4)	0,67
	Vrai positif	91% (69)	100% (14)	
Chiralpak IA	Vrai négatif	35% (42)	100% (5)	0,72
	Vrai positif	87% (69)	94% (16)	
Chiralcel OJ	Vrai négatif	30% (46)	40% (5)	0,66
	Vrai positif	80% (64)	67% (12)	
Chiralpak ID	Vrai négatif	26% (34)	100% (5)	0,74
	Vrai positif	90% (70)	93% (15)	

Tableau 5.5 : Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction « racémiques élués avant la prédiction - vrai positif » et « racémiques élués après la prédiction – vrai négatif »

Si on s'intéresse à la prédiction de séparation sur les racémiques élués avant la prédiction (Tableau 5.6), 100% des prédictions sont correctes pour les vrais positifs (racémiques élués avant la prédiction et séparés) contre 12% pour les vrais négatifs (racémiques élués avant la prédiction et co-élués).

		Jeu d'estimation	Jeu de validation	AUC
Chiralcel OD	Vrai négatif	44% (25)	12% (8)	0,82
	Vrai positif	88% (58)	100% (13)	

Tableau 5.6 : Matrice de confusion pour le jeu d'estimation et de validation concernant la capacité de prédiction pour les racémiques élués avant la prédiction « séparés - vrai positif » et « co-élués – vrai négatif »

Les conditions opératoires du jeu de validation sont plus éluantes que celle du jeu d'estimation. En effet, le jeu de validation a été analysé avec un gradient de 10% à 40% de méthanol alors que le jeu d'estimation a été analysé en mode isocratique avec 10% de méthanol. Si on s'attache à prédire l'élution d'un racémique avant ou après « la prédiction de rétention achirale », on prend un risque d'obtenir un biais dans l'estimation de la prédiction. L'AFD 4 classes n'est pas applicable à la prédiction d'un jeu de validation réalisé dans des conditions différentes de celui de jeu d'estimation.

Application des modèles Analyse Discriminante 2 classes

L'analyse discriminante a été utilisée en première intention dans **un but descriptif** afin d'identifier les caractéristiques structurales (variables quantitatives explicatives) communes à la catégorie des racémiques séparés ou non séparés. Les descripteurs moléculaires ayant une influence, positive ou négative, sur la séparation énantiomérique, ont été déterminés sur chaque système chromatographique. *Est-il alors possible d'utiliser ces modèles dans un but prédictif ?*

Pour une molécule donnée, dont les descripteurs moléculaires sont connus, il est possible de déterminer la probabilité de séparation sur un système préalablement caractérisé et modélisé. Les conditions opératoires employées sont sensiblement différentes des conditions de caractérisation des systèmes chromatographiques : une phase mobile plus éluante en mode gradient, un débit plus faible pour permettre le screening de colonnes parallèles, une double détection permettant d'identifier, de manière plus sûre, la séparation ou non des énantiomères.

Dans le cas du Proglumide, les probabilités de séparation sur chaque système sont présentées dans la table 5.7. Si l'on avait considéré seulement les 4 probabilités les plus élevées, on aurait obtenu un résultat positif puisque, expérimentalement, une séparation est obtenue sur Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralpak IC, et Chiralpak IA.

	Pr_{AD}	Pr_{OD}	Pr_{IC}	Pr_{IA}	Pr_{AS}	Pr_{IE}	Pr_{ID}	Pr_{IB}	Pr_{OJ}
	0.970	0.904	0.741	0.683	0.558	0.523	0.288	0.171	0.147
$\alpha_{exp.}$	1.24	1.34	1.32	1.07		$\alpha = 1$	$\alpha > 1$		

Tableau 5.7 : Evaluation de la probabilité de séparation du Proglumide par Analyse Factorielle Discriminante

Cependant, on constate qu'avec une probabilité de 28%, une séparation est observée sur Chiralpak ID ($\alpha = 1.17$) alors que ce n'est pas le cas avec une probabilité de 52% sur Chiralpak IE.

Les probabilités de séparation du Bendroflumethiazide sur chaque système sont présentées tableau 5.8. L'ordre de la prédiction théorique est la suivante : AD-OD-IC-IA-AS-OJ-IE-IB-ID, avec une probabilité de succès supérieure à 40%. Expérimentalement, une séparation est obtenue sur toutes les PSC, sauf Chiralcel OD pour laquelle les conditions opératoires ne permettaient pas une exploitation du chromatogramme. Il est intéressant de souligner qu'en positionnant la barre de risque à 60%, des résultats positifs sont obtenus avec une inversion d'ordre d'élution des deux énantiomères : Chiralpak IC (-/+) versus Chiralpak AS (+/-).

Pr_{AD}	Pr_{OD}	Pr_{AS}	Pr_{OJ}	Pr_{IA}	Pr_{IB}	Pr_{IC}	Pr_{ID}	Pr_{IE}
1,000	0,984	0,659	0,638	0,751	0,585	0,795	0,424	0,592

Tableau 5.8 : Evaluation de la probabilité de séparation du Bendroflumethiazide par Analyse Factorielle Discriminante

Il est important d'indiquer que dans 27 à 55% des cas, les conditions du jeu de validation ne sont pas favorables pour des performances chromatographiques convenables (rétention totale des racémiques ou pics dégradés). Cet outil peut être utilisé comme un premier filtre pour diminuer le nombre de supports énantiosélectifs lors d'un screening. De plus, il est important de souligner que si on prédit la faisabilité d'une séparation, la limitation de cette méthode concerne la qualité de la séparation ou la valeur d'alpha α .

Conclusion générale

Ce projet de recherche rapporte la rationalisation des procédures de séparation des composés chiraux à visée pharmaceutique ou cosmétique. De manière générale, il consiste à améliorer la compréhension des phénomènes intervenant dans le mécanisme de reconnaissance chirale afin de minimiser, en termes de temps et de coût, les procédures de séparations chirales actuelles.

La démarche de ce projet consiste à fragmenter le mécanisme de reconnaissance chirale en deux volets. Dans une première partie, l'emploi du modèle modifié des paramètres de solvation a permis de construire des modèles de rétention d'un large panel de phases stationnaires chirales en chromatographie en phase supercritique. Pour faire face à la diversité et la multiplication des PSC, l'ensemble de ces études a conduit à la mise en place de cartographies « rétentives » de phases chirales en SFC. Elles s'appuient sur l'utilisation d'outils chimiométriques (analyse en composante principale et classification ascendante hiérarchique) et de visualisation (diagramme en étoile). Ces cartes d'identités permettent de guider le chromatographe quant au choix de phases orthogonales vis-à-vis d'impuretés achirales. Cette base théorique pourrait, à l'avenir, se révéler utile dans le cadre du développement de nouvelles PSC.

Si des résultats cohérents et rationnels ont été mis en relief, certains ont pu les remettre en question en raison de conditions opératoires trop restrictives employées. En effet, ces études ont été réalisées en mode isocratique CO_2/MeOH (90:10), 25°C, 150 bar, 3 ml/min. Qu'en est-il si la composition de la phase mobile est modifiée ? Nous nous sommes donc concentrés sur l'influence de la nature du co-solvant en SFC (polarité et effet stérique) sur deux PSC polysaccharides. Ces modèles ont été utiles pour prédire la rétention relative d'un racémique dans plusieurs systèmes chromatographiques. Il est important de rappeler qu'une seule valeur de rétention est attribuée puisque deux énantiomères partagent le même jeu de descripteurs moléculaires.

Deux études préliminaires relèvent de résultats encourageants :

- L'identification des différences entre les phases mobiles liquide (en chromatographie liquide à polarité de phase normale) et supercritique. Nous avons ainsi démontré que le mode chromatographique SFC sur les PSC polysaccharides n'était pas équivalent au

mode NPLC auquel on le rattache souvent. Il paraît essentiel de mieux appréhender les différences entre ces deux modes chromatographiques afin d'envisager le transfert chiral HPLC-SFC de manière plus rigoureuse.

- La compréhension du mode d'action des additifs sur la discrimination chirale. Nous avons montré que les additifs acides induisent peu de modifications, probablement car la phase mobile CO₂-alcool est déjà acide. En revanche, les additifs basiques permettent d'éluer les composés basiques plus rapidement. L'effet sur l'énantiosélectivité n'est pas nécessairement positif, mais l'énantiorésolution est souvent améliorée car les pics sont affinés et symétrisés. Une évaluation plus complète des effets des additifs nécessite une réévaluation du modèle LSER en prenant en compte des descripteurs ioniques.

Le second aspect de nos travaux met en jeu des analyses factorielles discriminantes pour étudier l'influence de la structure moléculaire sur le processus de séparation. Nous avons démontré à travers de nombreux exemples qu'il s'agit d'un outil pertinent pour décrire le processus de discrimination chirale. Cependant, les capacités prédictives des modèles demandent à être améliorées.

La première piste de réflexion concerne la réévaluation du modèle modifié des paramètres de solvation. En effet, bien que les descripteurs actuels soient intéressants pour décrire les énantioséparations, ils ne sont pas suffisants pour les prédire. Un autre jeu de descripteurs, peut-être peu compréhensibles mais permettant de construire un modèle aux meilleures capacités prédictives, devrait être sélectionné. Les descripteurs de chiralité pourraient également être envisagés mais leur compréhension reste peu intuitive.

Le deuxième axe de réflexion concerne l'utilisation d'autres outils pour réaliser des modèles prédictifs plus performants. Dans le chapitre III, nous avons appliqué la régression PLS (pour « Partial Least Squares »). Son utilisation a été privilégiée car il existe une colinéarité entre les variables (descripteurs moléculaires), ce qui peut perturber les estimations des paramètres du modèle et leur interprétation.

Un troisième axe de réflexion paraît nécessaire concernant l'évaluation du signe de chiralité (+/-) dans les modèles statistiques. En effet, la connaissance de l'ordre d'élution des énantiomères apporterait un élément supplémentaire significatif pour comprendre les mécanismes de séparation.

Annexe 1

Descripteurs moléculaires ¹

Les descripteurs moléculaires reflètent numériquement la structure moléculaire, électronique et géométrique d'une molécule. Ils peuvent être classés en plusieurs catégories :

- Les descripteurs 1D considèrent la nature et le nombre des atomes et sont calculés à partir de la formule brute. Par exemple, la masse molaire est un descripteur 1D.
- Les descripteurs 2D considèrent la connectivité des atomes, les groupes d'atomes et sont calculés à partir de la formule développée :
 - les descripteurs constitutionnels considèrent la composition chimique
 - les descripteurs topologiques considèrent la connectivité des atomes dans une molécule (par exemple, les indices de Kier, de Wiener, de Balaban)
- Les descripteurs 3D considèrent la stéréochimie de la molécule :
 - descripteurs électroniques et thermodynamiques (enthalpie vibrationnelle)
 - descripteurs de surface.

Afin d'éliminer la redondance d'information, la sélection de descripteurs pertinents peut être réalisée à l'aide d'outils d'analyse de données tels que l'analyse en composantes principales.

N.B : pour appréhender la flexibilité des molécules cycliques et les liaisons hydrogènes intramoléculaires, une solution éventuelle serait de calculer le nombre de tous les conformères possibles et en déduire un indice de flexibilité.

¹ J. Dubois-Chevalier, L.M. Allory, C. Vrain. *Chimiothèque ; vers une approche rationnelle pour la sélection de sous-chimiothèques*.p241. Thèse de doctorat, chimie. Orléans : Université d'Orléans, 2011

Annexe 2

Méthodes d'Analyses de Données

Notre projet a débuté par une étude exploratoire dont le but était de dépouiller une masse de données chromatographiques importantes, c'est à dire visualiser, classer, interpréter, transformer les données, réduire la dimensionnalité et/ou détecter les valeurs aberrantes.

Régression linéaire multiple

C'est un outil qui permet de modéliser et prédire une variable quantitative en fonction d'une combinaison de variables explicatives. Il en résulte un modèle mathématique du type :

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n + \varepsilon \quad (\text{A.1})$$

Dans le cadre de notre étude, cette approche a été utilisée pour déterminer la variabilité des données chromatographiques (Y : logarithme de facteur de rétention) en fonction des 7 descripteurs moléculaires, définis par X.

Cette méthode permet d'estimer le poids des variables explicatives et de les considérer si elles apportent une information significative au modèle. La qualité de l'ajustement du modèle est estimé par le coefficient de détermination ajusté $R^2_{\text{ajusté}}$. Compte tenu de l'hétérogénéité des systèmes étudiés, on attend des valeurs supérieures à 0,8.

Classification ascendante hiérarchique (CAH)

C'est une méthode de classification non supervisée dont le but est de former des clusters homogènes, sans a priori sur leur nombre.

Dans le cadre de notre, on cherche à déterminer des regroupements clairs et objectifs de systèmes chromatographiques. Les critères de similarité sont les rétentions et les séparations. La construction dépend fortement de la méthode d'agrégation qui définit la distance entre les

classes. Nous utilisons le critère de Ward afin de minimiser la perte d'inertie inter-classes. La distance entre les différentes observations est de type Euclidienne.

La forme de l'histogramme des niveaux des nœuds donne une information sur la structure des données. Lorsque des sauts importants sont observés, on a une agrégation de structures homogènes. C'est en partie sur cette base qu'est créée la troncature qui détermine des groupes homogènes. On obtient alors un dendrogramme décrivant la répartition des individus dans chaque classe.

Analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale est un outil très utilisé pour étudier les relations entre les variables et mettre en relief les différences et similarités entre les individus².

Dans le cadre de nos études, les systèmes chromatographiques sont projetés dans un espace à dimensions réduites, définies par des composantes principales indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales. Les similarités entre les observations sont évaluées en fonction des corrélations avec les composantes principales.

Cependant, des précautions doivent être prises quant à la valeur des axes pour une interprétation fiable. En effet, les deux premières composantes portent le maximum de l'inertie totale alors que les suivantes expliquent la variance résiduelle. De plus, la limitation de cette méthode repose sur la difficulté à évaluer des regroupements objectifs. Utiliser la CAH en support de l'ACP peut s'avérer utile pour la formation de clusters de manière fiable.

Analyse factorielle discriminante (AFD)

L'analyse factorielle discriminante est une méthode à la fois descriptive et prédictive. Le but est d'étudier la relation entre une variable qualitative (ayant m modalités) et diverses variables quantitatives explicatives V. Cette méthode diffère de l'ACP car le nombre de composantes est ici lié au nombre de modalités. De plus, l'ACP est une méthode non supervisée alors que l'AFD est une méthode supervisée, puisque les classes sont imposées à

² M.R. Euerby, P. Petersson, W. Campbell, W. Roe, J. Chromatogr. A 1154 (2007) 138.

M.R. Euerby, P. Petersson, J. Chromatogr. A 1088 (2005) 1.

M. Lämmerhofer, M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, J. Sep. Sci. 31 (2008) 2572.

priori par l'opérateur, selon sa connaissance initiale de son ensemble échantillon. Par exemple, dans notre cas, les classes peuvent être « racémique séparé sur le système chromatographique étudié » et « racémique non séparé ». A partir de m modalités de la variable qualitative, on obtient au maximum $(m-1)$ axes factoriels. De plus, chaque axe factoriel minimise la variance à l'intérieur d'une modalité et maximise les différences entre les classes (figure A.1).

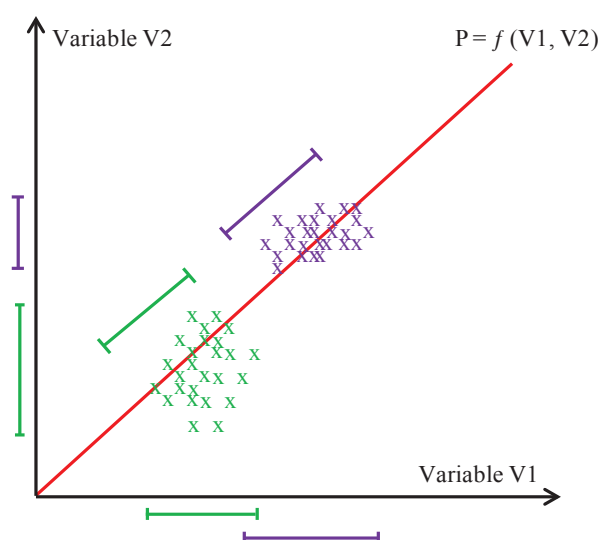


Figure A.1 : Chaque axe permet de minimiser la variance intra-classe d'une modalité et maximiser la variance inter-classes.

Annexe 3

Syame Khater, Caroline West*

Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for the direct determination of enantiomeric purity of provitamin B5 in cosmetic formulations with mass spectrometric detection

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 102 (2015) 321-325



Short communication

Development and validation of a supercritical fluid chromatography method for the direct determination of enantiomeric purity of provitamin B5 in cosmetic formulations with mass spectrometric detection



Syame Khater, Caroline West*

Université d'Orléans, ICOA, CNRS UMR 7311, Pôle de Chimie, rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Received in revised form

26 September 2014

Accepted 29 September 2014

Available online 13 October 2014

Keywords:

Chiral separation

Enantiomeric purity

Dexpanthenol

Cosmetics

Validation

ABSTRACT

A rapid and efficient chiral supercritical fluid chromatography (SFC) method has been developed for the quantitative determination of panthenol enantiomers in cosmetic formulations (cream, lotion, wipe, and exfoliant). Indeed, the pharmacological effect only depends on the D form (Dexpanthenol) thus accurate measurement of its enantiomeric purity in formulated cosmetic products is of interest. The samples were prepared with liquid–liquid extraction followed by solid-phase extraction on Adsorbex amino cartridges. After testing several enantioselective columns in an attempt at reversing the elution order to have the minor enantiomer eluted first, the best separation of enantiomers and internal standard (N-acetyl-L-alanine) was achieved on a 3 μ m-amylose-type immobilized polysaccharide chiral stationary phase (Chiralpak IA) in less than 6 min with a simple mobile phase comprising carbon dioxide and 11% methanol pumped at 2.3 mL/min, 25 °C and 150 bar backpressure. Supercritical fluid chromatography coupled to both an optical diode-array detector and a user-friendly single-quadrupole mass spectrometer (Waters QDa) equipped with electrospray ionization source has been used. The on-line coupling ensures the technique to be more informative and improves detection sensitivity, as underivatized panthenol has a poor UV absorption. The limit of quantification (LOQ) achieved with single-ion recording was 0.5 μ g/mL. The method was validated in terms of linearity, precision and accuracy and satisfactory results were obtained.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chirality is nothing new in the pharmaceutical industry, where it has long been known that two enantiomers often have significantly different bioactivity. Consequently, introduction of the sole eutomer (enantiomer with the desired activity) in the formulated pharmaceutical products is favored. However, the cosmetics and personal care field has been slower to embrace the use of “chirally correct ingredients”, in order to prevent allergic reactions, ineffectiveness, and penetration issues.

Dexpanthenol (*pantothenyl alcohol* or *Provitamin B5*, Fig. 1) is an active ingredient of numerous vitamin B-complex supplements and cosmetic formulations (lotions, rinses, creams, ointments) for its beautifying and invigorating action and its restorative and

soothing properties [1]. Once the skin penetration is performed, the small molecule is converted into pantothenic acid which is a precursor in the biosynthesis of coenzyme A. The acid form plays an important role in the Krebs cycle and cellular energy source (metabolism of lipids, proteins, gluconeogenesis, steroid hormones, and porphyrins) [2]. Lack of pantothenic acid, also known under the name “anti-stress vitamin”, causes many kinds of deficiency disease, irritation of the skin, dermatitis, depigmentation of the hair and stunted growth [3].

Its pharmacological effect relies on the D-(R)-panthenol (eutomer) while the L-(S)-isomer (distomer) is inactive. In order to determine the enantiomeric purity, several methods have been reported. Non-aqueous titration method [4], spectrophotometric [5], fluorimetric [6] and microbiological [7] assays have all been applied, or chiral chromatographic methods. König and Sturm [3] determined enantiomeric purity of derivatized panthenol by capillary gas chromatography. Xie et al. [8] described a derivatization procedure converting panthenol into 3,5-dinitrophenyl-carbamate

* Corresponding author. Tel.: +33 238494778; fax: +33 238417281.
E-mail address: caroline.west@univ-orleans.fr (C. West).

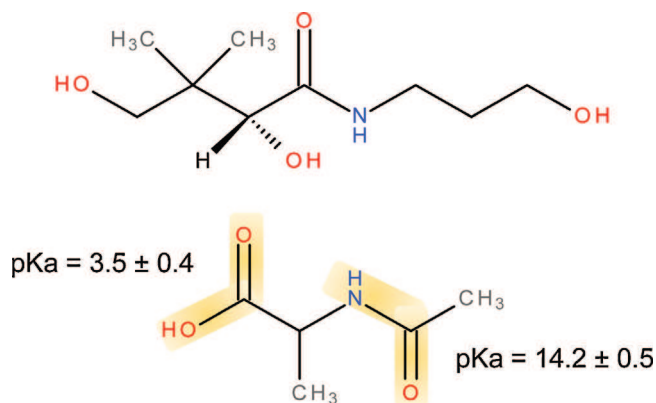


Fig. 1. Chemical structure of (a) Dexpanthenol ($C_9H_{19}NO_4$) and (b) N-acetyl-L-alanine (internal standard).

derivative and its analysis in liquid chromatography on Kromasil CHI-DMB chiral stationary phase. Although it has a low $\log P$ value (-0.92 ± 0.6), its analysis in packed column supercritical fluid chromatography (SFC) could be considered [9]. Two references reported SFC methods with polysaccharide-based chiral stationary phases. In both cases, an amylose phase (Chiralpak IA and Chiralpak AS) and UV detection were involved [10,11].

The application of packed column SFC has emerged as a favorite for enantioselective method development, in regard to the short analysis time achievable with high flow rates, fast equilibration times, high separation efficiency and low solvent consumption. In addition, SFC-UV and SFC coupled to mass spectrometry (MS) are generally implemented to monitor screening and automated chiral separation or purity assessment in the industry [12]. The development and validation of a hyphenated SFC-UV-MS method is reported here for the direct determination of enantiomeric purity of underivatized panthenol in different cosmetic formulations (lotion, cream, wipe, exfoliant).

2. Material and methods

2.1. Chemicals, solvents and reagents

DL-Panthenol, D-Panthenol and N-acetyl-L-alanine (internal standard) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) (Fig. 1). The solvents used were HPLC-grade methanol (MeOH), ethanol and 2-propanol provided by VWR (Fontenay-sous-Bois, France), chloroform obtained from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France) and tetrahydrofuran from J.T. Baker (Paris, France). The Carrez treatment involves the addition of Potassium ferrocyanide $K_4[Fe(CN)_6]$, purchased from Merck (Guyancourt, France), and zinc acetate from Carlo Erba (Peypin, France). Formic acid was obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Carbon dioxide of industrial grade 99.5% was provided by Messer (Puteaux, France). Cosmetic samples were bought at the local supermarket.

2.2. Chromatographic columns and solid-phase extraction cartridges

A screening was performed on thirteen chiral stationary phases in order to select the most suitable in terms of retention and enantioseparation. All columns are named in Fig. 2. They were available in dimensions of 150×4.6 mm, apart from Whelk-O1 (250×4.6 mm) and were all $5 \mu m$ particles, apart from Chiralpak IA and IB ($3 \mu m$). The columns were provided by Chiral Technologies, Sigma-Aldrich and Regis Technologies. Solid-phase extraction was

performed on Adsorbex NH2 100 mg (Merck Millipore, Guyancourt, France).

2.3. Instrumentation

The Waters (Millford, MA, USA) Acquity UltraPerformance Convergence ChromatographyTM (UPC²) was equipped with a binary solvent delivery pump compatible with mobile phase flow rates up to 4 mL/min and pressures up to 414 bar, an autosampler that included partial loop volume injection system, a backpressure regulator, column oven compatible with 150 mm length columns and a photodiode-array (PDA) detector. A QDa single-quadrupole mass detector with electrospray ionization source complements the optical detection by extending the limits of sample detection as DL-Panthenol lacks of UV chromophore. The isocratic solvent manager is used as a make-up pump and is positioned before the mass detector. The main flow stream is then splitted by the on-board flow-splitter assembly. Most of the column flow goes to the UV detector and only a portion goes to the MS. MassLynx software (V4.1) was used for system control and data acquisition.

2.4. Chromatographic conditions

The initial screening of enantioselective stationary phases was performed in the following conditions: the mobile phase was CO_2 -MeOH (90:10, v/v); flow rate was 3 mL/min; temperature was set at $25^\circ C$ and the outlet pressure was maintained at 150 bar for all columns. $1 \mu L$ of a 10 ppm panthenol solution was injected on a $10 \mu L$ -loop and the PDA detection wavelength was set at 210 nm. Chromatographic conditions were then optimized in order to increase MS signal-to-noise ratio.

The mass detector unit was pre-optimized by the manufacturer. The studied racemate was detected in negative electrospray ionization mode in m/z range 30–400, scan rate 10 pts/s, capillary voltage 0.8 V, cone voltage 15 V, sampling frequency 8 Hz and the ion source temperature was set at $600^\circ C$. Nitrogen was used as nebulizing gas. Make-up flow was 0.5 mL/min with 90% methanol–10% water comprising 1% formic acid. The main ions observed for panthenol and the internal standard were at m/z 204 and 130 respectively, corresponding to $[M-H]^-$.

2.5. Preparation of sample solutions

The starting point of the methodology is based on reference [13]. However, after several tests, our final sample preparation procedure is somewhat different from this reference as it does not include introduction of an acid solution (that was found to bring no improvement), and the SPE cartridges that were found to yield the best recovery were polar phases and not the recommended octadecyl-bonded silica. Sample pre-treatments were performed on different cosmetic formulations (cream, milk, aqueous lotion, make-up remover, and baby-wipe). The sample treatment for the cream used to validate the method was as follows: 0.2 g cream sample was weighed into a 15 mL glass tube. The quantification of Panthenol in different cosmetic formulations was performed by using an internal standard in order to correct the MS signal variations. So 1 mL of 10 mg/mL N-acetyl-L-alanine was added at this stage. Then 3 mL of chloroform/water (3:1) were added and mixed with a vortex. The liquid–liquid extraction allows separating the target water-soluble molecules from other oil-soluble ingredients and surfactants (such as sodium lauryl sulfate). Carrez treatment was then performed to achieve macromolecules water-soluble sedimentation [2]. It consists in adding $200 \mu L$ of a solution of zinc acetate (20%) and $200 \mu L$ of a solution of potassium ferrocyanide (10%). The solution was then centrifuged for 15 min at 5000 rpm (with Jouan BR4i multifunction Centrifuge from Thermo Electron).

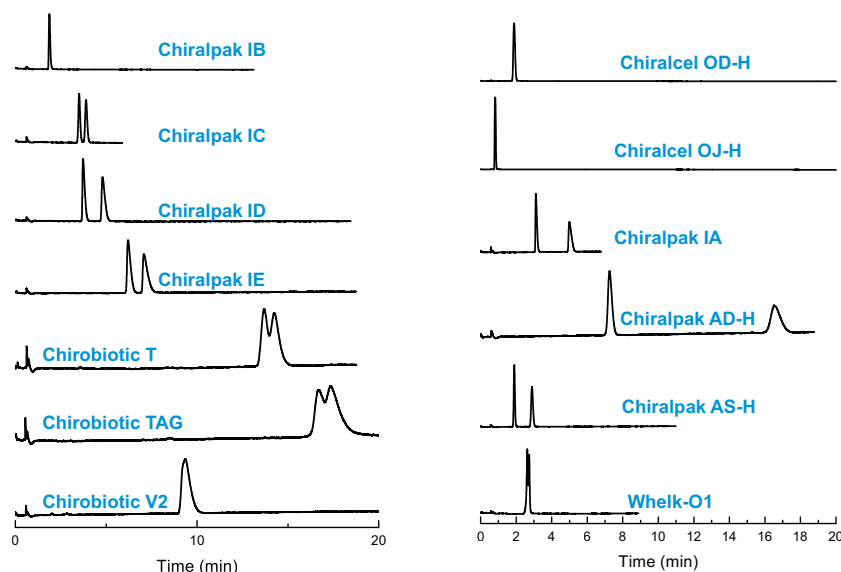


Fig. 2. Initial screening on thirteen chiral stationary phases using the following conditions: CO₂-MeOH 90:10 (v/v); Flow rate 3 mL/min; Temperature 25 °C; Outlet pressure 150 bar; PDA set at 210 nm. D-panthenol corresponds to the first eluted peak on all chiral stationary phases.

Solid phase extraction (SPE) was then performed to concentrate the target molecules and remove all the interfering ingredients on polar cartridges. The amino cartridge was flushed with 2 mL methanol and 2 mL water to activate the stationary phase. 2 mL of sample were loaded and the cartridge was then washed with a mixture of tetrahydrofuran and acetonitrile (8:2). The molecules of interest were eluted during the washing step while interfering components were retained on the polar adsorbent. The tetrahydrofuran/acetonitrile solution containing the analytes was evaporated to dryness and then the residue was redissolved in 0.5 mL of methanol. As a result, the theoretical concentration factor is equal to 4.

3. Results and discussion

3.1. Method development

Thirteen different chiral stationary phases (CSP) were screened using methanol as modifier in carbon dioxide, in order to achieve suitable enantioselectivity and retention time, but also in an attempt at observing the minor enantiomer (L-panthenol) as first eluted enantiomer. Based on previous works [10,11], Chiralpak IA and Chiralpak AS were firstly evaluated to assess the feasibility of SFC conditions, but other columns were screened to see if any of them would provide better results.

Fig. 2 presents the chromatograms obtained on each CSP. The cellulose-type (Chiralcel OD and OJ, Chiralpak IC and IB), macrocyclic glycopeptides (Chirobiotic T, V2 and TAG) and Pirkle-type (WO1) CSP poorly or did not resolve the two enantiomers in the operating conditions selected for the screening. In our previous studies comparing non-halogenated [14] and chlorinated [15] polysaccharide stationary phases, it appeared that amylose phases provide generally larger average separation factors than cellulose phases. Indeed, Fig. 2 shows that good enantioresolution was achieved on all amylose-type phases (AD, AS, IA, ID and IE). While Chiralpak AD shows strong enantioresolution capabilities, the analysis time exceeds 15 min. Its immobilized homologous Chiralpak IA displays good enantioselectivity and lower retention time. The main advantage of the immobilization procedure is the possible use of non-conventional solvents to improve the solubility

of the compounds, in contrast to the coated phases [16]. Indeed, dichloromethane and chloroform are often used to improve poorly soluble samples. In the present study, sample treatment requires the use of tetrahydrofuran and chloroform to better dissolve the cosmetic formulation thus the possible use of an immobilized phase to inject samples in strong solvents was considered an advantage.

N-acetyl-L-alanine was chosen as internal standard (IS) in regard to its retention time and structural similarity to the target molecules. Satisfactory separation between the IS and the target molecules was obtained in less than 6 min under isocratic mode (Fig. 3d). However, an acidified mobile phase (formic acid 20 mM in methanol) was required to ensure better peak shape for the IS, without any significant changes in panthenol selectivity or retention.

Investigations were then performed in regard to the mobile phase composition. Different modifiers were screened: methanol, ethanol, isopropanol and methanol/chloroform in carbon dioxide. Methanol achieved efficient separation and provided the highest MS signal-to-noise ratio, which is desirable to measure low levels of impurities.

The amylose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral selector used in the study is immobilized on 3 µm particles of porous silica gel. There were few investigations on the impact of 3 µm CSP particles to speed up analysis maintaining resolution [17,18]. For the particular case of panthenol, in the selected operating conditions, some decrease in the flow rate was found to increase efficiency. It was thus set at 2.3 mL/min. Other physical parameters such as temperature, outlet pressure, and modifier percentage were also tested to explore their influence on efficiency, separation factors and signal-to-noise ratio. Temperature and outlet pressure had a limited impact. The percentage of modifier was significant on the variation of the MS signal-to-noise ratio as slight increase of the percentage of modifier increases this ratio. Finally, the optimized conditions were as follows: mobile phase is CO₂-MeOH with 20 mM formic acid 89:11 (v/v); flow rate was 2.3 mL/min; temperature was set at 25 °C and the outlet pressure was maintained at 150 bar; injection volume was 1 µL.

The first attempt to extract panthenol from cosmetic formulations was to simply dilute the material in organic solvent or perform liquid-liquid extraction. Fig. 3a (UV trace) and b (ESI-MS single-ion recording) presents the analysis of the cream treated

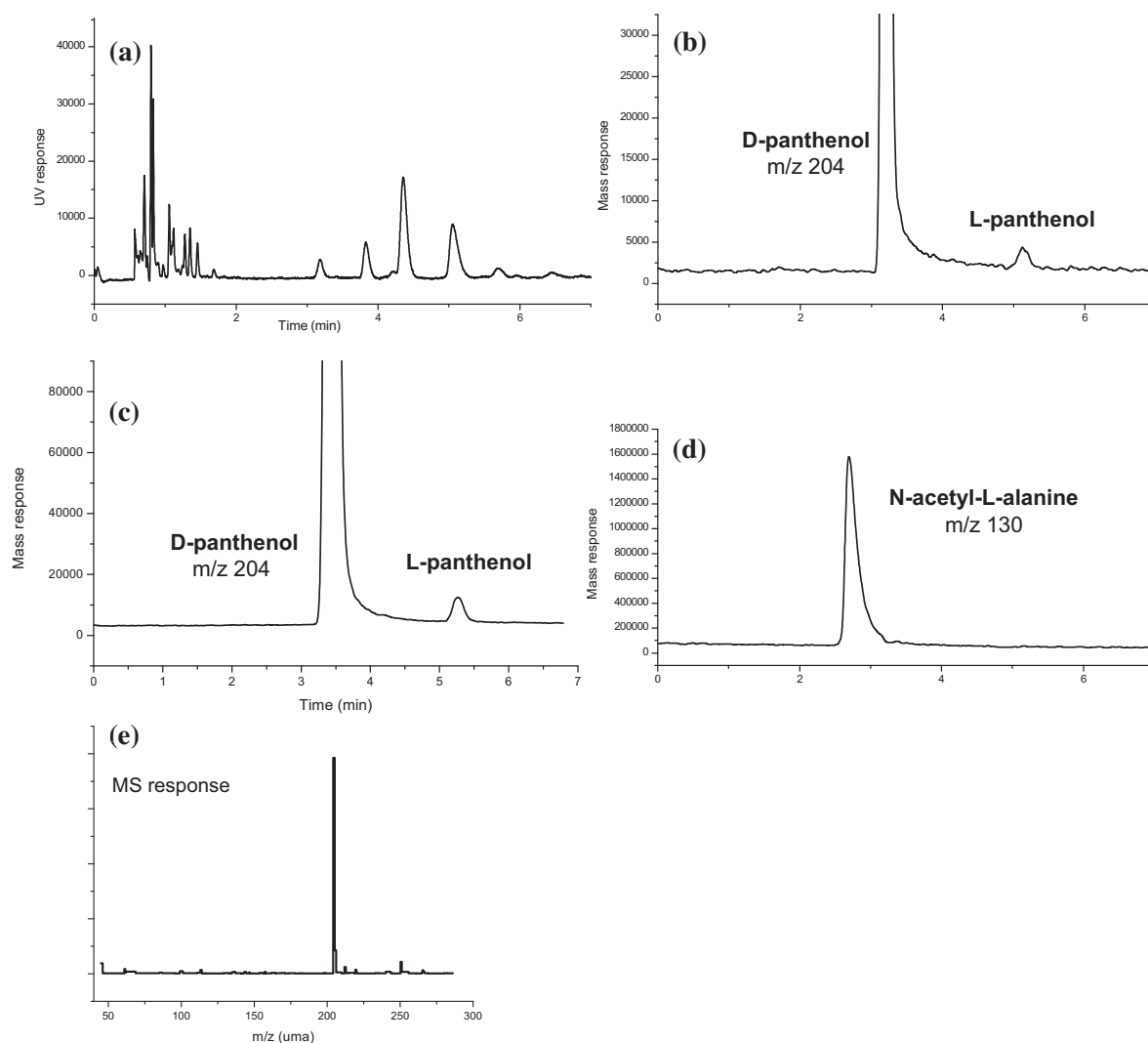


Fig. 3. Evaluation of sample treatment of a cosmetic formulation (cream) after liquid–liquid extraction (a) UV and (b) ESI-MS single-ion recording of the extract, or (c) after liquid–liquid extraction followed by pre-concentration on amino cartridge; (d) SIR signal of the internal standard N-acetyl-L-alanine; (e) mass spectrum for panthenol. Operating conditions: Chiralpak IA (150 × 4.6 mm, 3 μm), CO₂-MeOH + 20 mM formic acid 89:11 (v/v), 2.3 mL/min, 25 °C, 150 bar outlet pressure, injection volume 1 μL.

after liquid–liquid extraction. While the UV trace exhibits plenty of unknown peaks, the target molecule is UV transparent. This result confirms both the necessity of SPE treatment and the need for on-line MS detection to afford reliable monitoring of the *m/z* ratio of both minor and major enantiomers.

When dealing with secondary active ingredients in cosmetics, pre-concentration procedures are required to ensure the removal of interfering molecules and simultaneous concentration of the target molecule. In baby-care formulation, D-panthenol may be included in small weighted proportions ranging between 1% and 5%. Thus an expected L-panthenol impurity of 1% of the total panthenol amount may range between 0.01 and 0.05% in the formulated product. As a result, liquid–liquid extraction (LLE) was followed by solid-phase extraction (SPE) to concentrate the samples and improve the detection of the minor enantiomer. The improved MS signal can be observed in Fig. 3c.

4. Method validation

4.1. Selectivity

The specificity of the assay was evaluated by analyzing a blank cosmetic extract. Another cream containing no panthenol but

otherwise comparable formulation was used as blank sample. It was analyzed after having been submitted to the same sample treatment (LLE followed by SPE), to ensure sample treatment specificity. No interference component was found at the retention times of the target molecules (panthenol enantiomers and internal standard).

4.1.1. Limits of quantification

The limit of quantification (LOQ) is the lowest amount of analyte which can be quantitatively determined with suitable statistical certainty [19]. LOQ is determined by analyzing samples at known concentrations and establishing the minimum level at which the analyte can be reliably detected. It represents the concentration of analyte that would yield a signal-to-noise ratio of 10 and it was estimated to be 0.50 μg/mL.

4.1.2. Linearity of response

The linearity of an analytical procedure is its ability to obtain test results which are directly proportional to analyte concentration within a given range [19]. The linearity (Table 1) was evaluated in a range from 0.075 μg/mL to 15 μg/mL (100%) for L-panthenol and from 0.75 μg/mL to 15 μg/mL for D-panthenol. Three replicates were performed for each concentration level. The calibration

Table 1
Significant figures related to the calibration curve.

Linearity	Results for D-panthenol
Calibration range	0.75–5 µg/mL
Calibration points	5
Correlation coefficient	0.99
Slope	0.6442 (Sa 0.0098)
Intercept	0.2693 (Sb 0.0915)
Statistical tests	
Fisher's test $F(\text{exp}) = 34,277$ (Fth)	Significant
Cochran's test $C(\text{exp}) = 0.57$	Isovariance
Linearity	Results for L-panthenol
Calibration range	0.075–5 µg/mL
Calibration points	5
Correlation coefficient	0.99
Slope	0.4191 (Sa 0.0081)
Intercept	0.5950 (Sb 0.7254)
Statistical tests	
Fisher's test $F(\text{exp}) = 34,277$ (Fth)	Significant
Cochran's test $C(\text{exp}) = 0.57$	Isovariance

curves consist in plotting internal standard/enantiomer concentration ratio against internal standard/enantiomer peak area ratio. The calibration curves were linear with $r^2 > 0.99$. The regression equations were $y = 0.6442x + 0.2693$ for D-panthenol and $y = 0.4182x + 0.9186$ for L-panthenol where y was the peak area and x was the panthenol concentration. All results and statistical tests are presented in Table 1. The Cochran test identified the homogeneity of the variance over the calibration range at a 0.05 level risk. The Fischer-Snedecor test ($F_{\text{exp}} > F_{\text{th}}$) demonstrated that the slope was significant at a 0.05 level risk.

4.1.3. Precision

The precision of an analytical method is expressed as the variance, standard deviation or coefficient of variance of a series of measurements. Six individual solutions at 15 mg/mL, 0.75 mg/mL and 75 µg/mL were prepared and injected in triplicate. The results are presented in Table 2.

The intra-assay precision presents a relative standard deviation (RSD%) comprised between 0.12% and 0.5% for retention time and 1.3% and 3.7% for peak area. The inter-day precision assessed on three different days is lower than 0.5% for retention times and 5% for peak area ratio.

4.1.4. Accuracy

The accuracy of the method was estimated at 10%, 5% and 2% of impurity levels for the L-panthenol. The accuracies were found acceptable with recovery values in a range of 97–109% of the theoretical values. The results are presented in Table 3.

Table 2
Statistics related to precision ($n = 3$).

Concentration	Intra-day precision		
	t_R D-panthenol	t_R L-panthenol	Area [L]/[D]
75 µg/mL	0.50	0.43	3.47
0.75 mg/mL	0.30	0.11	3.70
15 mg/mL	0.18	0.12	1.30
Concentration	Inter-day precision		
	t_R D-panthenol	t_R L-panthenol	Area [L]/[D]
75 µg/mL	0.39	0.32	3.95
0.75 mg/mL	0.44	0.37	5.03
15 mg/mL	0.45	0.50	2.47

Table 3
Results related to accuracy.

Theoretical ee %	Experimental	Recovery %
98	97.580	97.6%
95	94.530	109.0%
90	89.690	106.0%

A chromatogram of a cream sample is presented in Fig. 3c. The mass detector allows determining the enantiomeric excess (EE%), which cannot be achieved by UV detection. In the tested baby-care formulation, dexpanthenol was present as major enantiomer with 98% EE%. The cream contained at least 3.5% of D-panthenol and 0.08% of L-panthenol. Other samples were tested (lotion, exfoliant and baby-wipes) to assess the feasibility of the method on other formulations. No particular interference was noticed on these other samples.

5. Conclusion

A hyphenated SFC-UV-MS method is reported for the direct determination of enantiomeric purity of panthenol in different baby-care formulations (lotion, cream, wipe, and exfoliant). An efficient sample preparation method was achieved with liquid–liquid extraction followed by solid-phase extraction in order to clean and pre-concentrate the samples. A general screening on thirteen chiral stationary phases (Pirkle-type, polysaccharide and macrocyclic antibiotic CSPs) was developed to identify the appropriate enantioselective support. Then, the operating conditions were optimized in regard to efficiency, separation factors and MS signal-to-noise ratio and the method was validated. Finally, the mass detector affords higher sensitivity and promotes the monitoring of the m/z ratio of both minor and major enantiomers in formulated cosmetic products.

Acknowledgment

Waters is greatly acknowledged for the Acquity UCP² and QDa systems let at our disposal. Pilar Franco (Chiral Technologies), Dave Bell (Sigma–Aldrich) and Jelena Kocergin (Regis Technologies) are acknowledged for the kind gift of columns. Jieyi Zhang and Alain Zedek are acknowledged for technical assistance in the development of the sample preparation procedure.

References

- [1] E. Proksch, H. Nissen, J. Dermatol. Treat. 13 (2002) 173–178.
- [2] J. Plonka, A. Toczek, V. Tomczyk, Food Anal. Methods 5 (2012) 1167–1176.
- [3] W.A. König, U. Sturm, J. Chromatogr. 328 (1985) 357–361.
- [4] United Pharmacopeia 30, the national formulary 25, US Pharmacopeia convention, 2007.
- [5] A.F. Zappala, C.A. Simpson, J. Pharm. Sci. 50 (1961) 845–847.
- [6] R.G. Panier, J.A. Close, J. Pharm. Sci. 53 (1964) 108–110.
- [7] M. Weiss, I. Sonnenfeld, E. DeRitter, S. Rubin, E.L. Jolley, J.A. Kuck, J.J. Moran, C.O. Willits, Anal. Chem. 23 (1951) 1687–1689.
- [8] Y.M. Xie, J. Luo, X.H. Tang, D. Yang, X.F. Huo, A. Liu, X. Hu, X. Song, H. Song, Chromatographia 69 (2009) 1025–1029.
- [9] C. West, Chromatogr. Today (2013) 22–27, May/June.
- [10] C.T. Europe, Application Guide Software, 2010.
- [11] F. Geiser, M. Shaimi, L. Betz, M. Schultz, A. Collier, W. Champion, J. Lee, Pittcon 2000 New Orleans, 2000.
- [12] C.J. Welch, M. Biba, J.R. Gouker, G. Kath, P. Augustine, P. Hosek, Chirality 19 (2007) 184–189.
- [13] H.X. Mao Xiqin, P.A.N. Wei, Chin. J. Chromatogr. 28 (2010) 1061–1066.
- [14] S. Khater, Y. Zhang, C. West, J. Chromatogr. A 1363 (2014) 278–293.
- [15] S. Khater, Y. Zhang, C. West, J. Chromatogr. A 1363 (2014) 294–310.
- [16] L. Miller, J. Chromatogr. A 1256 (2012) 261–266.
- [17] C. Hamman, M. Wong, I. Aliagas, D.F. Ortwine, J. Pease, D.E. Schmidt Jr., J. Victorino, J. Chromatogr. A 1305 (2013) 310–319.
- [18] C. Hamman, M. Wong, M. Hayes, P. Gibbons, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3529–3536.
- [19] Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedure ICH-Q2A, 1995, March.

Annexe 4

Conditions opératoires du Chapitre III

La comparaison des phases mobiles liquides et supercritiques a été réalisée dans les conditions suivantes

Les analyses en chromatographie en phase supercritique ont été réalisées sur un système Acquity UPC² (Waters) :

Colonne:	Phase stationnaire : Lux Cellulose-1 Dimensions L x D (mm) : 250x 4.6 Diamètre de particules (µm) : 5.0
Phase mobile:	CO ₂ /co-solvant* (90 :10) * <i>ethanol et isopropanol</i>
Débit (ml/min):	3
Température du four (°C):	>25
Régulateur de pression P_{outlet} (bar) :	150
Détecteur:	Détecteur à barrettes de diodes
Phase de dissolution:	méthanol

Les analyses en chromatographie liquide à polarité de phase normale ont été réalisées sur une chaîne HPLC Lachrom Merck Hitachi (*Pompe L-7100, Passeur Automatique L-7200, DAD 5430 Hitachi Chromaster, DEDL Sedex 75*).

Colonne:	Phase stationnaire : Lux Cellulose-1 Dimensions L x D (mm) : 250x 4.6 Diamètre de particules (µm) : 5.0
Phase mobile:	Heptane/co-solvant (90 :10) <i>ethanol et isopropanol</i>
Débit:	1
Température du four (°C):	25
Détecteur:	Détecteur à barrettes de diodes couplé avec un détecteur évaporatif à diffusion de lumière
Phase de dissolution:	méthanol

Les figures 3.16 à 3.18 proviennent d'une collaboration avec l'équipe d'Eric Francotte (Novartis Global Discovery Chemistry, Bâle).

Syame KHATER

**Rationalisation des procédures de séparation des composés chiraux à
visée pharmaceutique et cosmétique**

Résumé :

L'énantiomérisme est un sujet majeur dans des domaines divers, en particulier celui de la pharmacie (principe actifs et métabolites). La commercialisation de médicaments sous forme racémique a longtemps été privilégiée au dépend d'éventuels effets secondaires. Depuis les années 90, le développement du nombre d'entités énantiomériquement pures est en hausse, notamment grâce au développement des techniques de séparation. La chromatographie chirale, à l'aide de support énantiosélectif, s'est très vite imposée pour la résolution rapide et directe de stéréoisomères. Cependant, la faible compréhension des mécanismes intervenant dans la reconnaissance chirale limite un choix rationnel reposant sur la structure des composés chiraux, conduisant à une procédure de développement de méthode de séparation chirale systématique, fastidieuse et coûteuse d'essais et erreurs.

Ce projet de recherche se situe à l'interface des sciences analytiques et de la chémo-informatique. Il consiste en une amélioration de nos connaissances sur le mécanisme de reconnaissance chirale afin d'aborder le développement de méthode chirale de manière plus rigoureuse.

Mots clés : Chiralité, chromatographie en phase supercritique, Chémo-informatique, QSRR

**Streamlined procedures for the chiral separation of compounds of
pharmaceutical and cosmetic interest**

Summary:

The subject of enantiomer separation is a major issue in various fields, particularly pharmaceuticals (metabolites and active principle). To prepare pharmaceutical formulations, the racemic form has long been favored at the expense of possible side effects. Since the 90s, the development of the number of enantiomerically pure entities is rising, particularly through the development of separation techniques. Chiral chromatography using enantioselective stationary phases is an excellent technique for fast and direct resolution of stereoisomers. However, limited understanding of the mechanism leads to tedious and expensive trial-and-error systematic chiral method development. No clear guideline for choosing a chromatographic system is available for a new chiral drug.

In this project, we wish to achieve a better knowledge of enantioselective separation techniques in order to help in the choice of separation method that will be the most appropriate for any given chiral separation. This project is based on the rationalization of large amounts of experimental data with the help of modelling and chemometric techniques to unravel the enantioselective recognition mechanism.

Keywords : Chirality, supercritical fluid chromatography, chemoinformatic, QSRRs



**Institut de Chimie Organique et
Analytique
Université d'Orléans, CNRS UMR 7311,
BP 67059, rue de Chartres, 45067
Orléans Cedex 2, France**

